

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН, Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской
академии наук»
(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН)

На правах рукописи

Макрушин Кирилл Валерьевич

L-лизин- α -оксидаза гриба
Trichoderma cf. aureoviride Rifai VKM F-4268D

(03.02.03 – Микробиология)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н., с.н.с. А.Ю. Аринбасарова

Пушино 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Грибы рода <i>Trichoderma</i>	14
1.1.1. Общая характеристика грибов рода <i>Trichoderma</i>	14
1.1.2. Практическое использование грибов рода <i>Trichoderma</i>	17
1.1.2.1. Применение в промышленности.....	17
1.1.2.2. Использование в сельском хозяйстве	18
1.1.2.3. Применение в медицине	21
1.2. Оксидазы L-аминокислот	22
1.2.1. Строение L-ОАК.....	23
1.2.2. Распространение L-ОАК в природе.....	25
1.2.3. Физико-химические свойства L-ОАК	25
1.2.4. Биологические свойства L-ОАК	26
1.2.4.1. Антибактериальные, противовирусные и антипротозойные свойства L-ОАК	27
1.2.4.2. Антипролиферативные и противоопухолевые свойства L-ОАК.....	28
1.2.5. Применение L-ОАК в медицине	29
1.2.6. Механизмы биологических эффектов L-ОАК.....	31
1.2.6.1. Механизмы биологического действия, связанные с образованием активных форм кислорода (АФК).....	31
1.2.6.2. Биологическое действие L-ОАК, связанное с молекулярными механизмами, не включающими действие АФК.....	33
1.2.6.3. Механизмы биологического действия L-ОАК, связанные с истощением запасов свободных аминокислот	34
1.2.7. Функциональная роль L-ОАК в живых организмах	35
1.2.8. Способы получения ЛО	36
1.2.9. Выделение и очистка ЛО	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Микроорганизмы и их культивирование	38
2.1.1. Отбор активных штаммов-продуцентов ЛО.....	38

2.1.2. Получение накопительных культур.....	38
2.1.3. Твердофазное культивирование грибов <i>Trichoderma</i> на увлажненных пшеничных отрубях.....	38
2.1.4. Культивирование грибов <i>Trichoderma</i> в погруженной культуре (опыты в колбах) ...	39
2.1.5. Оптимизация синтеза ЛО грибом <i>Trichoderma</i> в биореакторах лабораторного типа	40
2.1.6. Получение посевного материала.....	40
2.1.7. Определение таксономической принадлежности штамма	40
2.2. Измерение активности ЛО.....	40
2.3. Выделение ЛО	41
2.3.1. Осаждение ЛО при помощи сульфата аммония.....	41
2.3.2. Выделение ЛО методом мембранной ультрафильтрации	41
2.4. Очистка ЛО	41
2.4.1. Очистка ЛО методом гидрофобной хроматографии.....	41
2.4.2. Очистка ЛО методом ионообменной хроматографии	42
2.5. Определение концентрации белка	42
2.6. Определение молекулярной массы и гомогенности фермента.....	42
2.6.1. Электрофорез в денатурирующих условиях.....	42
2.6.2. Нативный электрофорез в градиенте ПААГ.....	43
2.6.3. Эксклюзионная хроматография	43
2.7. Определение наличия изоферментов	43
2.8. Спектральные исследования ЛО.....	43
2.9. Идентификация кофактора ЛО	44
2.10. Определение зависимости активности ЛО от pH.....	44
2.11. Определение зависимости активности ЛО от температуры	44
2.12. Определение энергии активации ЛО.....	44
2.13. Определение термостабильности ЛО.....	45

2.14. Стабильность при хранении	45
2.15. Определение устойчивости к действию протеолитических ферментов	45
2.16. Устойчивость ЛО к действию детергентов и хаотропных агентов	45
2.17. Характеристика ПМР-спектров	46
2.18. Определение кинетических параметров ЛО	46
2.19. Исследование субстратной специфичности фермента	46
2.20. Определение антимикробного действия ЛО	47
2.21. Испытание препарата ЛО на стерильность.....	48
2.22. Устранение антимикробного действия	50
2.23. Анализ содержания аминокислот в среде роста <i>Trichoderma</i>	50
2.24. Определение пероксида водорода	50
2.25. Определение активности протеолитических ферментов в культуральной жидкости.	51
2.26. Определение пипеколиновой кислоты в культуральной жидкости	51
2.27. Измерение образования АФК в клетках.....	51
2.28. Лиофилизация ЛО	52
2.29. Статистическая обработка данных	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1. Отбор штамма-продуцента ЛО (твердофазная ферментация).....	53
3.2. Определение таксономического положения штамма <i>Trichoderma</i> sp. 6.....	54
3.3. Оптимизация синтеза ЛО грибами <i>Trichoderma</i> в условиях глубинного культивирования.....	56
3.3.1. Подбор состава среды культивирования (опыты в колбах)	56
3.3.1.2. Влияние различных солей на биосинтез ЛО.....	57
3.3.1.3. Подбор оптимального количества субстрата роста	60

3.3.1.4. Влияние сахаров на биосинтез ЛО грибом <i>T. cf. aureoviride</i> Rifai ВКМ F- 4268D ..61	
3.3.1.5. Влияние аденина, аденозина, гуаназина, инозина, АМФ, АДФ, АТФ, L-глутамина, L-гистидина, глицина на биосинтез ЛО61	
3.3.2. Влияние температуры на биосинтез ЛО в условиях глубинного культивирования (опыты в колбах).....61	
3.3.3. Влияние аэрации на биосинтез ЛО (оптимизация процесса в ферментерах).....62	
3.3.4. Влияние рН на биосинтез ЛО (оптимизация процесса в ферментерах)63	
3.3.5. Влияние температуры на биосинтез ЛО (оптимизация процесса в ферментерах)64	
3.3.6. Проведение стандартных ферментаций. Отработка процесса в 10 л ферментерах67	
3.4. Выделение и очистка ЛО67	
3.4.1. Выделение и очистка ЛО методом осаждения белков с помощью сульфата аммония или мембранной ультрафильтрацией67	
3.4.2. Очистка ЛО с использованием медь-имидазольного осаждения72	
3.5. Физико-химические свойства ЛО76	
3.5.1. Молекулярная масса ЛО76	
3.5.2. Спектральные характеристики ЛО77	
3.5.3. Кофактор ЛО.....77	
3.5.3.1. Определение наличия простетической группы ЛО спектрофотометрическим методом.....77	
3.5.3.2. Идентификация кофактора ЛО с помощью ВЭЖХ78	
3.5.4. Наличие изоферментов ЛО.....79	
3.5.5. Зависимость активности ЛО от рН79	
3.5.6. Субстратная специфичность ЛО.....80	
3.5.7. Кинетические характеристики ЛО.....81	
3.5.8. Зависимость активности ЛО от ионной силы раствора.....83	
3.5.9. Зависимость активности ЛО от температуры.....84	
3.5.10. Энергия активации ЛО.....84	
3.5.11. Термостабильность ЛО86	
3.5.12. Устойчивость ЛО к действию протеолитических ферментов86	
3.5.13. Устойчивость ЛО к действию ДСН, гуанидинхлорида и мочевины.....88	
3.5.14. Спектр протонного магнитного резонанса88	
3.6. Определение стерильности препарата ЛО89	
3.7. Лиофилизация фермента.....90	

3.8. Функциональная роль ЛО.....	92
3.8.1. Антагонистическое действие ЛО.....	92
3.8.2. Определение некоторых метаболитов в среде роста гриба в условиях синтеза ЛО...99	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	130

ВВЕДЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Оксидазы L-аминокислот привлекают все большее внимание исследователей благодаря разнообразию их биологической активности. В частности, выявлены бактериостатические, противопротозойные, противогрибковые, противовирусные, антипролиферативные, противоопухолевые свойства этих ферментов, а также влияние на агрегацию тромбоцитов (Березов, 2005; Лукашева и др., 2012; Pollegioni *et al.*, 2013; Pokrovsky *et al.*, 2017).

Оксидазы L-аминокислот – флаavin-содержащие ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз. Эти ферменты широко распространены в природе и обнаружены у животных (Murthy *et al.*, 1999; Kitani *et al.*, 2007) и микроорганизмов, включая грибы (Sikora *et al.*, 1982; Nidermann and Lerch, 1991; Weber *et al.*, 1994; Calderon *et al.*, 1997; Папоян и др., 2001) и бактерии (Lucas-Elio *et al.*, 2006).

В зависимости от микроорганизма-продуцента оксидазы L-аминокислот различаются по своим биохимическим свойствам: молекулярной массе, каталитической активности, субстратной специфичности, биологической активности и локализации в клетке (Pollegioni *et al.*, 2013).

L-лизин- α -оксидаза (ЛО) (E.C.1.4.3.14) – один из ферментов, перспективных в энзимотерапии опухолей, основанной на разной чувствительности нормальных и опухолевых клеток к дефициту факторов роста, в том числе, аминокислот (Березов, 2005).

ЛО катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием аммиака, пероксида водорода и α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты (Лукашева и др., 2002).

Впервые ЛО получили японские исследователи из гриба *Trichoderma viride* и показали противоопухолевое действие на культуре раковых клеток в 1979 г. (Kusakabe *et al.*, 1979, 1980). С тех пор они являются монополистами по производству фермента в мире.

В последние годы разрабатываются новые противоопухолевые препараты на основе ферментов, и продемонстрированы существенные достижения в области доклинических и клинических испытаний. Но до настоящего времени в онкологии применяется единственный противоопухолевый фермент L-аспарагиназа, эффективный при лечении лейкоза (Pokrovsky *et al.*, 2014, 2017).

В опытах *in vivo* показано, что ЛО также эффективна при лечении лейкоза, кроме того, она активна в отношении и других опухолей (Pokrovsky *et al.*, 2013). Лекарственный препарат на основе ЛО не заменит L-аспарагиназу, но позволит расширить диапазон терапевтического использования противоопухолевых ферментов.

До настоящего времени в России создание лекарственной формы ЛО сдерживалось отсутствием активного штамма-продуцента, а также отсутствием эффективной технологии получения фермента. Разработанные ранее методы выделения и очистки ЛО были неэффективными, трудоемкими или не отвечали экологическим нормам производства из-за использования больших объемов органических растворителей (Смирнова и др. 1984; Пат. РФ 2002108326 (13) А, 2004, Weber *et al.*, 1994).

Среди продуцентов ЛО особое внимание привлекают грибы рода *Trichoderma*, которые являются единственными известными в настоящее время продуцентами внеклеточных оксидаз L-аминокислот, в том числе ЛО (Лукашева и др., 2012). Факт внеклеточного накопления фермента предполагает создание более технологичной и экономичной схемы его выделения.

Известно, что грибы *Trichoderma* синтезируют множество метаболитов (литические ферменты, антимикробные агенты различного химического строения), что обеспечивает им высокий адаптационный потенциал (Harman, 2006; Vinale *et al.*, 2008; Navarova *et al.*, 2012; Bernsdorff *et al.*, 2016). Именно способность к синтезу таких соединений играют важную роль в формировании микробиоценозов почвы и лежит в основе использования этих грибов в качестве экологически безопасных биопестицидов в борьбе с инфекционными болезнями растений.

На фоне детального исследования этих метаболитов, контролирующих численность фитопатогенов, факт синтеза внеклеточной ЛО грибами *Trichoderma* остается за рамками изучения ее физиологической роли в природном окружении, в том числе как возможного фактора биоконтроля.

Степень разработанности темы исследования

Изучением биосинтеза и свойств ЛО занимались многие ученые (Kusakabe *et al.*, 1980; Weber *et al.*, 1994; Лукашева и др., 2002; Смирнова и др., 2015; Chen *et al.*, 2012; Amano *et al.*, 2017; Pokrovsky *et al.*, 2017). Интерес к ЛО обусловлен перспективой ее использования в энзимотерапии опухолей, основанной на использовании ферментов в качестве одного из самых тонких и избирательных инструментов для направленного изменения метаболизма раковых клеток (Березов 2005; Лукашева и др., 2012; Pollegioni *et al.*, 2013; Pokrovsky *et al.*, 2017).

К ферментным препаратам предъявляется ряд определенных требований: кроме биологической активности и низкой токсичности обязательны узкая субстратная специфичность, высокая активность, стабильность, отсутствие необходимости добавления эндогенных кофакторов (в том числе, коферментов) и медленный вывод из организма. Сочетание этих требований, а также доступность получения из непатогенных микроорганизмов ограничивает перспективу использования многих противоопухолевых средств. Сравнение с

известными характеристиками других противоопухолевых ферментов позволит дать реальный прогноз применения ЛО в онкологической практике.

Впервые фермент ЛО был выделен из экстракта гриба *T. viride* японскими учеными в лаборатории профессора Soda (Kusakabe *et al.*, 1980). Этими же авторами было показано торможение роста ферментом культуры лейкозных клеток (Kusakabe *et al.*, 1979).

Многие исследователи (Weber *et al.*, 1994; Лукашева и др., 2002; Смирнова и др., 2009; Шнайдер 2012) также используют грибы *Trichoderma* в качестве продуцента ЛО. Сравнительно невысокие эффективности процессов, как биосинтеза, так и выделения ЛО не позволяли получать качественный препарат фермента ЛО в количествах, необходимых для клинических испытаний и последующего практического использования в терапии опухолей. Удовлетворительная активность препаратов ЛО достигалась только в виде композиций в присутствии усилителей биологической активности (антиоксиданты, витаминный препарат, иммуномодуляторы и др.) (Пат. РФ 2002108326 (13) А, 2004).

Создание эффективной конкурентоспособной схемы получения ЛО с использованием нового активного штамма-продуцента является ключевым этапом создания лекарственного препарата ЛО.

Грибы *Trichoderma* привлекают внимание исследователей также в связи с изучением системной устойчивости растений (Návarová *et al.*, 2012; Vogel-Adghough *et al.*, 2013; Bernsdorff *et al.*, 2016). Обработка растений препаратами *Trichoderma* сопровождается развитием у них устойчивости к фитопатогенам и различным стрессовым факторам.

Было показано антимикробное действие культуральной жидкости грибов *Trichoderma* (Попова и Садыкова, 2014; Смирнова и др., 2017). Внесение в почву биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* снижает содержание патогенной микрофлоры в ризосфере растений и приводит к ее оздоровлению (Алимова и др., 2006, 2007; Садыкова и др., 2015). Показано также, что контроль численности патогенов грибами *Trichoderma* обусловлен их способностью синтезировать антибиотические соединения и комплексы литических ферментов (Harman, 2006; Bernsdorff *et al.*, 2016).

В настоящее время не изучен механизм антимикробного действия ЛО. Установлен механизм действия других оксидаз аминокислот (фенилаланин-оксидазы) из грибов *Trichoderma* (Chen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011, 2012; Hanane-Fadila and Fatima, 2014).

Ничего не известно также об участии ЛО из грибов *Trichoderma* в индуцировании системной устойчивости растений.

Цель работы - получить гомогенный препарат ЛО для медицинских исследований, а также показать возможную функциональную роль внеклеточной ЛО для продуцента.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. выделить активный штамм-продуцент ЛО среди представителей грибов рода *Trichoderma*;
2. определить оптимальные условия культивирования продуцента и синтеза ЛО (тип культивирования, субстрат роста, pH, температура, pO_2);
3. разработать эффективный метод очистки ЛО;
4. изучить основные ферментативные свойства ЛО, значимые для использования в медицине: кинетические характеристики, устойчивость к действию температуры, pH, протеолитических ферментов, детергентов, стабильность при хранении и др.;
5. определить внеклеточные метаболиты гриба, предопределяющие функции ЛО для продуцента в природной окружающей среде;
6. изучить антимикробное действие ЛО.

Научная новизна

Среди 14 штаммов *Trichoderma* из ВКМ (ИБФМ РАН) и 8 штаммов изолятов из образцов лесных почв был найден новый высокоактивный природный штамм-продуцент ЛО. Выделенный штамм был идентифицирован и депонирован в ВКМ (ИБФМ РАН) как *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

Впервые показан синтез ЛО в условиях роста *Trichoderma* на средах, содержащих семена культурных и диких злаковых растений.

Впервые подобраны условия культивирования гриба, позволяющие получить высокий уровень биосинтеза ЛО. Накопление фермента в ростовой среде достигало (175 Е/г субстрат). В настоящее время данные о получении такого высокого уровня биосинтеза ЛО при любых типах ферментации *Trichoderma* в научной литературе отсутствуют.

Предложены два метода очистки фермента: один из них базируется на общепринятых (рутинных) подходах; второй – оригинальный метод, основанный на осаждении ЛО из культуральной жидкости солями Cu^{2+} . Оба метода позволяют получить гомогенный препарат ЛО с высокой активностью (100 Е/мг белка) и практическим выходом 60%.

Впервые исследованы кинетические характеристики фермента с учетом аллостерических эффектов. Были оценены коэффициент Хилла ($h = 2,03 \pm 0,14$) и константа Михаэлиса-Ментен ($K_m = 1,015 \cdot 10^{-5} M$), величина которой показывает высокое сродство ЛО к лизину.

Впервые выявлены факторы, предопределяющие возможную функциональную роль ЛО как участие во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Фитопатоген». Показано, что биосинтез фермента сопровождается накоплением в среде роста пипеколиновой кислоты и пероксида водорода – элиситоров системной устойчивости растений.

Впервые изучены механизмы антимикробного действия ЛО как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами.

Научно-практическое значение

С использованием найденного нами активного штамма-продуцента разработан лабораторный регламент получения ЛО. Полученный гомогенный препарат ЛО проходит доклиническое исследование в ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина.

Установленные свойства гомогенного препарата ЛО, такие как высокие активность и стабильность, а также узкая субстратная специфичность и высокое сродство к лизину позволяют его использование в медицинских исследованиях как перспективное лекарственное средство в терапии онкологических заболеваний.

Кроме того, указанные свойства предполагают использование ЛО в биоинженерии белков, а также для создания биохимических тестов для определения лизина.

Активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий позволит использовать ЛО в качестве перспективного потенциального инструмента в разработке новых лекарственных средств против бактерий, резистентных к антибиотикам.

Результаты исследования дополняют представления о взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген», развитии системной устойчивости растений, а также об использовании грибов рода *Trichoderma* в качестве биоконтрольного агента и их адаптационном потенциале.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых эффективных препаратов на основе грибов *Trichoderma* - активных продуцентов ЛО - для защиты растений от фитопатогенов и обеспечения высокой урожайности и хранения полученных сельскохозяйственных продуктов.

Личный вклад автора

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Положения, выносимые на защиту:

- Штамм-продуцент ЛО *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, отобранный в результате скрининга, используется для проведения эффективных процессов биосинтеза ЛО в биореакторах лабораторного типа. Оптимизированы условия биосинтеза ЛО, что обеспечивает высокий уровень накопления ЛО в культуральной жидкости (175 Е/г субстрата, 12,5 Е/мл).

- Создана эффективная схема получения гомогенного препарата ЛО с высокой удельной активностью (100 Е/мг белка) с выходом 60%. Оформлен лабораторный регламент получения фермента.

- Показано антимикробное действие ЛО против грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ГИСК 453) и грамположительных (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus durans* ВКМ В-603, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ГИСК 272) бактерий, а также микроскопических грибов (*Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Fusarium decemcellulare* ВКМ F-1179 и *Rhizoctonia solani* ВКМ F-895). Механизм антимикробного действия основан на образовании экзогенного H_2O_2 (в результате каталитической реакции), а также генерации внутриклеточных АФК.

- ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D характеризуется высокой активностью, низкой энергией активации, высокой селективностью и стереоспецифичностью, высоким сродством к L-лизину, стабильностью. Указанные свойства играют значимую роль в антагонистическом действии против бактерий и фитопатогенных грибов.

- Процесс синтеза ЛО грибом *Trichoderma* сопровождается накоплением в ростовой среде пипеколиновой кислоты и H_2O_2 - элиситоров системной устойчивости растений. Этот факт, а также антимикробное действие ЛО позволяют предположить функциональную роль этого фермента для *Trichoderma* в природном окружении как участие во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген».

Степень достоверности и апробация работы

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении науки института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук.

Часть работы выполнена в рамках гос. Контракта № 9-1-ЦФ-08 а также научно-технической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2007-2012 гг.

Основные положения, заключение и практические предложения, сформулированные в диссертации, отвечают целям и задачам работы. Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном современном оборудовании. Обоснованность и достоверность результатов исследований подтверждена статистической обработкой полученных данных.

Основные положения работы были представлены в рамках проекта "УМНИК" (Пушино, 2008-2010), Российской школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2008), международной школе-конференции «Биология-наука 21 века»

(Пушино, 2010), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009, 2011, 2017), IV съезде микологов России (Москва, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 5 статей в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы данных.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 235 ссылки и приложения. Текст работы занимает 131 страницу, содержит 36 рисунков и 18 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Аринбасаровой А.Ю. и научному консультанту д.б.н. Меденцеву А.Г. за практическую помощь, ценные советы и поддержку в написании диссертации. Автор искренне признателен д.ф.-м.н. Кутышенко В.П. (лаборатория ЯМР-исследований биосистем, ИТЭБ РАН, г. Пушкино) за помощь в установлении структуры белковой молекулы ЛО, д.б.н., проф. Лукашевой Е.В. (кафедра биохимии им. академика Березова Т.Т., РУДН) за исследование противоопухолевой активности ЛО, к.б.н. Чигиновой Н.И. (Всероссийская коллекция микроорганизмов) за помощь в идентификации штамма продуцента, Баскунову Б.П. (ИБФМ РАН) за помощь в проведении масс-спектрометрических исследований, Лысанской В.Я. (ВКМ ИБФМ РАН) за проведение анализа аминокислот, д.х.н. Крупянюк В.И. за помощь в изучении кинетических параметров ЛО, к.б.н. Ашина В.В. за помощь в проведении исследований и всех коллег лаборатории адаптации микроорганизмов принимавших участие в представленной работе на различных этапах ее выполнения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Грибы рода *Trichoderma*

1.1.1. Общая характеристика грибов рода *Trichoderma*

Грибы рода *Trichoderma* относятся к одному из трех известных классов анаморфных грибов *Hyphomycetes*, мицелиальные формы которых образуют конидиальные спороношения свободно, а не внутри или на поверхности каких-либо структур. Грибы рода *Trichoderma* встречаются на овощах и фруктах, а также в поверхностных слоях почвы на растительном перегное, повсеместно колонизируя те места, где есть мульча (растительные остатки), которая не может быть метаболизирована другими микроорганизмами. Многие виды *Trichoderma* доминируют в ризосфере растений, являются антагонистами фитопатогенных грибов и бактерий, поражающих корневую систему и другие органы растений. (Harman, 2000).

Представители рода *Trichoderma* не требовательны к источникам углерода и азота. Это может быть объяснено наличием множества разных метаболических путей и внушительным набором вторичных метаболитов. Грибы рода *Trichoderma* широко известны способностью к разложению полисахаридов, таких как целлюлоза и гемицеллюлоза и таких труднодоступных биополимеров как хитин (Berges *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1988).

Большинство штаммов *Trichoderma* являются несовершенными грибами (не образуют половых стадий развития) и считаются строго митотическими клональными грибами (виды *Hypocrea* и близкородственный класс в *Hypocreales* имеют анаморфизмы, приписанные к *Trichoderma*). В последние годы растет число телеоморфов *Hypocrea*, которые благодаря макромолекулярным исследованиям связывают с обычно встречающимися анаморфами *Trichoderma*. Однако, несмотря на эти значительные продвижения в знаниях о роде *Trichoderma*, его таксономия до сих пор остается неполной, и установление различий между видами вызывает ряд вопросов (Srivastava *et al.*, 2014) Усовершенствование классификации необходимо также для составления экологической характеристики видов *Trichoderma* (Danielson and Davey, 1973; Davet, 1985; Papavizas, 1985; Claydon *et al.*, 1987; Widden, 1980; Widden and Scattolin, 1988), прогнозирования опасности, связанной с токсичностью видов (Webster and Lomas, 1964, Dennis and Webster, 1971; Hou *et al.*, 1972; Hutchinson, 1972; Shaw and Taylor, 1979; Okuda *et al.*, 1982; Brückner and Przybylski, 1984; Taylor, 1986; Simon *et al.*, 1988; Almassi *et al.*, 1991; Dunlop *et al.*, 1989; Ghisalberti *et al.*, 1990; Ghisalberti and Sivasithamparam, 1991; Ghisalberti and Rowland, 1993), а также выявления возможностей применения грибов рода *Trichoderma* в биотехнологической практике (Sternberg and Doval, 1980; Goldman and Lucio de Azevedo, 1987; Morawetz *et al.*, 1992; Kubicek *et al.*, 1996). В конечном счете, дополненные видовые описания могут быть равнозначными биологическим единицам или "биологическим

видам", некоторые из которых могут также определенно коррелировать с телеоморфными видами.

Представители рода *Trichoderma* способны расти на минимальных средах, содержащих минеральные компоненты и какой-либо полисахарид, так как неприхотливы в отношении источников углерода и азота. Данное обстоятельство делает этот организм весьма удобным для использования в биотехнологических целях. Развитие *Trichoderma* определяется комплексом эдафических факторов, которые оказывают влияние на морфологию, физиологию и стадии онтогенеза гриба. Покоящимися структурами у *Trichoderma* являются конидии и хламидоспоры. Регуляция образования их различна. Конидиогенез связан с заключительными этапами онтогенеза, а хламидоспоры образуются в течение всего жизненного цикла гриба в ответ на целый ряд внешних факторов (Горленко и др., 1985). Несмотря на то, что грибы рода *Trichoderma* являются сапрофитами, нетребовательными к условиям окружающей среды, они все же нуждаются в оптимальных условиях существования необходимых для нормальной жизнедеятельности организма (Theodore and Panda, 1995). Известно, что такие факторы, как влажность, температурный и световой режим, доступность минеральных и органических питательных веществ, могут ускорять или замедлять рост и развитие гриба, а также определять переход от стадии покоя к вегетативному росту и формированию репродуктивных структур (Лугаускас, 1981; Patent USA, № 5422107).

По отношению к температуре Самуэльс (Samuels *et al.*, 1996) делит все известные виды *Trichoderma* на 3 группы: психрофилы, предел выносливости которых от +4 °С до +30 °С, а T_{opt} составляет 10-15 °С, мезофилы (20-40 °С, T_{opt} 26-28 °С) и термотолерантные виды, пределы выносливости которых находятся в диапазоне от 25 до 50 °С. Наиболее оптимальные температуры для роста и развития большинства видов этих грибов лежат в пределах 26-30 °С.

Другим немаловажным фактором, оказывающим большое влияющим на рост гриба, является рН среды. Показано, что именно от кислотности среды зависит поступление питательных веществ в клетку, развитие спороношения у грибов, а также активность внеклеточных ферментов. Исследованные Кредиксом виды *Trichoderma* способны расти в широком диапазоне рН от 2,0 до 7,0 с оптимумом рН = 4,0 (Kredics *et al.*, 2003). Для внеклеточных ферментов *Trichoderma* оптимальные значения рН были определены как рН=5,0 (β -глюкозидаза, целлобиогидролаза), рН=3,0 (β -ксилоназы) и рН=6,0-7,0 (протеазы, подобные трипсину и химотрипсину) (Алимова и др., 2007).

Почти все известные виды грибов рода *Trichoderma* можно отнести к облигатным аэробам. Грибы, в основном, растут на поверхности почвы или субстрата, но могут расти и в микроаэрофильных условиях. Эта способность дает возможность *Trichoderma* произрастать в толще почвы, в ризосфере растений, а также в условиях глубинного культивирования или при

росте в водяных пленках. Отмечено, что при глубинном культивировании в клетках мицелия этих грибов значительно снижалась активность сукцинатдегидрогеназы, а активность дегидрогеназы была высокой только на начальных этапах онтогенеза (Горленко, 1985).

Помимо вышеперечисленных факторов, большое влияние на развитие и рост гриба оказывает субстрат, на котором произрастает гриб, а также его доступность. При росте гриба на твердофазных, гетерогенных средах, подобных почве, обычной тактикой поиска пищи является тропизм, который обладает преимуществом по сравнению с таксисом. Количественной мерой успеха вида в колонизации среды является линейная скорость роста гиф. По стратегии жизни *Trichoderma* относят к r-k стратегам. По отношению к концентрации субстрата в среде культивирования выделяют олиготрофные и копиотрофные виды. Эффективное использование доступных питательных веществ основано на способности *Trichoderma* к более эффективному синтезу АТФ при метаболизме различных полимеров: целлюлозы, глюкана, хитина и др. Основная часть гидролизуемых *Trichoderma* полимеров в качестве мономера содержит глюкозу. Ключевые компоненты метаболизма глюкозы включают ферменты ассимиляции и транспорта. Эффективность транспортных систем глюкозы может быть критической при конкуренции с другими обитателями почвы. (Samuels *et al.*, 2002) У *Trichoderma harzianum* выделен ген *Gtt1*, который ответственен за транспорт глюкозы. Этот штамм присутствует в нишах, очень бедных питательными веществами. Для выживания ему необходимы внеклеточные гидролазы. Ген *Gtt1* экспрессируется только при очень низких концентрациях глюкозы в среде, когда ожидается, что сахарный транспорт ограничен конкуренцией за питательные вещества. Показано также, что содержание глюкозы в клетке увеличивается в 3-4 раза при внесении дополнительных копий *Gtt1*. Это указывает на то, что ген *Gtt1* играет дополнительную роль в условиях конкуренции за субстрат, позволяя грибу быстрее получить энергию от гидролизуемых полимеров и более интенсивно транспортировать глюкозу в клетки по сравнению с конкурентами (Berges *et al.*, 1993). Различные виды *Trichoderma* по-разному относятся к тем или иным субстратам и вырабатывают ряд ферментов, адаптированных к определенным источникам углерода. Выявлено, что *T. koningii* и *T. harzianum* являются антагонистами по отношению к источникам углерода. Два сравниваемых вида грибов по-разному реагировали на углеродсодержащие соединения. Органические кислоты (в частности, жирные кислоты) стимулировали рост у вида *T. koningii*, в то время как полисахариды (например, крахмал, инулин и рибоза), а также полиолы (например, арабит) использовались *T. harzianum*. Эта способность позволяет грибам наиболее успешно заселять множество экологических ниш, а также более выгодно в них сосуществовать друг с другом (Manczinger and Polner, 1985).

Представители рода *Trichoderma* способны расти в условиях повышенного содержания солей в почве, например, на полях с внесенными минеральными удобрениями или на морских

бережьях в зоне прилива. Солевой стресс не только не угнетает рост и развитие гриба, но может повышать численность популяции *Trichoderma* в зонах с повышенной соленостью (Алимова и др., 2007).

Еще одной интересной особенностью грибов рода *Trichoderma* является способность активно синтезировать низкомолекулярный железоспецифический хелат, переводящий соли железа, содержащиеся в почве, в хелатные комплексы, что останавливает рост грибов-конкуренентов, так как железо в почве является одним из лимитирующих факторов. Большинство видов *Trichoderma* выделяют в окружающую среду органические кислоты, такие как лимонная, глюконовая и фумаровая. Эти кислоты образуются при метаболизме углеродсодержащих соединений (главным образом, глюкозы) в среде обитания. Кислоты, выделяемые *Trichoderma*, переводят различные нерастворимые соли, например, содержащие фосфаты или карбонаты, в растворимые формы, которые могут быть впоследствии усвоены грибом. Таким образом, грибы рода *Trichoderma* способны оказывать влияние на минерализацию почв (Gómez-Alarcón and Torre, 1994; Yedidia *et al.*, 2001).

1.1.2. Практическое использование грибов рода *Trichoderma*

Многие виды *Trichoderma* являются продуцентами ферментов (целюлаз, хитиназ, пектиназ, ксиланаз, серинзависимых протеиназ и др.), используемых в целлюлозо-бумажной и пищевой промышленности, производстве моющих средств, при получении спирта, преобразовании отходов, содержащих целлюлозу и глюкозу (Harman and Kubichek, 1998, Harman *et al.*, 2004, Franco *et al.*, 2004, Xiong *et al.*, 2005), получении кормовых добавок (Ташпулатов, 1987, Samuels *et al.*, 1998, Скворцов и др., 2005) и в текстильной промышленности. На основе антибиотиков, токсинов и ферментов грибов этого рода получают препараты для биологического контроля болезней и стимуляции роста растений, получения трансгенных растений, *Trichoderma* также используется для очистки воды (Сидорова, 1980; Громовых и др., 2002; Гринько, 2004; Harman *et al.*, 2004; Алимова и др., 2007).

1.1.2.1. Применение в промышленности

На сегодняшний день основными ферментами, получаемыми промышленным способом из *Trichoderma*, являются целлюлазы. В настоящее время целлюлазы составляют 20 % мирового рынка ферментных препаратов и значительная их часть – ферменты из *Trichoderma*. Они были впервые использованы в сельском хозяйстве, в производстве кормов и в пищевой промышленности. С помощью целлюлаз, вырабатываемых грибами, проводится обработка

многих видов текстильных тканей. Ферментами обрабатывают ткани и волокно для его смягчения и придания ворсистости. С появлением целлюлолитических ферментов из *Trichoderma* стала возможной более дешёвая ферментативная обработка «тяжелого» льна и хлопка. Также с помощью этих энзимов производится процесс биошлифования ткани. Например, одежду типа denim невозможно получить без участия целлюлолитических ферментов, синтезируемых этими грибами (Harman and Kubicek, 1998). На основе целлюлолитических ферментов были созданы комплексные препараты Целловиридин В и Ворсолен.

Помимо текстильной промышленности препараты из *Trichoderma* нашли широкое применение в пищевой промышленности. Их активно применяют для производства алкоголя и получения спирта. Бета-глюканазу и целлюлазу из *Trichoderma* используют для бездрожжевого сбраживания ячменного солода в пивоварении. Комплексные ферментные препараты дают возможность упростить и удешевить процесс производства спирта, снизить время сбраживания на 15-20 ч, а также повысить конечный выход спирта (Алимова и др., 2007).

Гидролитические ферменты из *Trichoderma* с пектиназной, целлюлазной, хитиназной и глюканазной активностями используются в виноделии. Комплексы этих ферментов способствуют мацерации кожицы плодов и ягод (для увеличения выхода сока в процессе отжима), лучшему отделению сока от жмыха, повышению экстракции пигмента из кожицы винограда (для придания вину насыщенного цвета). В конце 80-х годов прошлого века был создан коммерческий препарат на основе комплекса ферментов *Aspergillus* и *Trichoderma* Cytolase 219TM, который испытывался на протяжении 4 сезонов (1989-1992 гг.) группой авторов на нескольких сортах белого винограда в северной Италии, а потом получил широкое распространение у виноградарей различных стран. Также комплексы гидролитических ферментов из *Trichoderma* нашли успешное применение и при производстве фруктовых соков (Алимова и др., 2007).

1.1.2.2. Использование в сельском хозяйстве

Наряду с интенсивным применением в промышленности, грибы рода *Trichoderma* также активно применяются и в сельском хозяйстве. Как было упомянуто выше (Harman *et al.*, 2004), *Trichoderma* выделяет ряд вторичных метаболитов, которые могут существенно изменять свойства почвенного покрова. Органические кислоты, выделяемые грибами рода *Trichoderma*, значительно влияют на минеральный состав почв, благодаря способности связываться с катионами нерастворимых солей (фосфатов, карбонатов), которые в большом количестве содержатся в почве, в нерастворимых или неусвояемых для растений формах. Грибы рода

Trichoderma обогащают почву такими катионами, как кальций, магний, марганец и железо, способствуя, таким образом, ее минерализации, что приводит к повышению плодородия почв в целом.

Известен также факт выделения грибами рода *Trichoderma* низкомолекулярных хелатообразующих соединений, которые связывают ионы двухвалентных металлов и удерживают их в растворимом состоянии в почве. Помимо минерализации почв, *Trichoderma* также оказывает большое влияние на микробиоту, расщепляя труднодоступные для других микроорганизмов биополимеры, такие как целлюлоза, лигноцеллюлоза, хитин, давая при этом богатые энергией мономерные формы, которые впоследствии могут быть метаболизированы почвенными микроорганизмами.

Известно также симбиотическое отношение между *Trichoderma* и некоторыми видами азотфиксаторов, где грибы обеспечивают азотфиксирующие бактерии источниками углеводов, а бактерии в свою очередь предоставляют грибам источники азота. Так, азотфиксирующая активность бактерий в составе ассоциаций с *Trichoderma* была на полпорядка выше, чем чистой культуры тех же азотфиксирующих бактерий (Винокурова, 1991). Наибольший стимулирующий эффект на азотфиксирующую способность почвы отмечен в почве с интродукцией *T. longibrachiatum*, а наименьший - с *T. reesei*.

Грибы рода *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* и др.) занимают приоритетное положение в защите растений от фитопатогенов. Было показано антимикробное действие культуральной жидкости грибов *Trichoderma* (Попова и Садыкова, 2014; Смирнова и др., 2017). Внесение в почву биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* снижает содержание патогенной микрофлоры в ризосфере растений и приводит к ее оздоровлению (Алимова и др., 2006, 2007; Садыкова и др., 2015). Показано также, что контроль численности патогенов грибами *Trichoderma* обусловлен их способностью синтезировать антибиотические соединения и комплексы литических ферментов (Harman, 2006; Bernsdorff *et al.*, 2016). При антагонистическом взаимодействии грибов рода *Trichoderma* с микроорганизмами почв именно синтез внеклеточных антибиотиков и токсинов различной природы приводит к фунгистазису почвенных грибов и гнилостной микрофлоры почвы.

Грибы рода *Trichoderma* обладают свойствами микофилии и паразитируют на других почвенных грибах (Тиунова и др., 1982; Harman *et al.*, 2004; Patent USA, № 6512166). Эти свойства делают незаменимым применение *Trichoderma* и ее метаболитов в сельском хозяйстве в качестве одного из эффективных средств для биоконтроля почв, а также средств для борьбы с вредоносной для растений биотой почвы. Внесение в почву биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* значительно снижает численность патогенных грибов в ризосфере растений и

приводит к ее оздоровлению. Было показано (Новикова и др., 1995), что антагонизм *Trichoderma* приводит к снижению численности и даже уничтожению нежелательных микроорганизмов в почве.

Грибы *Trichoderma* привлекают внимание исследователей также в связи с изучением системной устойчивости растений (Návarová *et al.*, 2012; Vogel-Adghough *et al.*, 2013; Bernsdorff *et al.*, 2016). Обработка растений препаратами *Trichoderma* сопровождается развитием у них устойчивости к фитопатогенам и различным стрессовым факторам.

До 2003 г. все препараты на основе этих грибов в России называли Триходермином, препаративные формы которых различаются в зависимости от исходного штамма, состава питательной среды, способа культивирования, титра готового препарата.

Колонизация корней грибами рода *Trichoderma* увеличивает скорость роста корней и всего растения, что приводит к повышению продуктивности культуры и урожая репродуктивных органов. Колонизация корней также помогает растению преодолеть абиотические стрессы и увеличивает усвоение питательных элементов. Некоторые виды рода *Trichoderma* способны вырабатывать фитогормоны, например, индолилуксусную кислоту (Harman *et al.*, 2004).

Немаловажную роль грибы рода *Trichoderma* играют и при производстве кормов для крупного рогатого скота и свиней. Еще недавно производство кормов представляло собой наиболее интенсивно растущую отрасль промышленной энзимологии, ферменты, используемые в кормопроизводстве, составляют 30 % от всех производимых ферментов (в год). В этой области появляются все новые препараты ферментов исключительно за счет ферментов *Trichoderma* (Kuhad *et al.*, 2011).

В основном все ферменты, используемые в кормопроизводстве, являются гидролазами. Суть технологии получения кормов заключается в следующем: сырьевые компоненты (отходы), содержащие сложные полисахариды – пектиновые вещества, целлюлозу, гемицеллюлозу и др., подвергаются воздействию комплексных ферментных препаратов *Trichoderma*, содержащих пектиназу, гемицеллюлазу и целлюлазу. Ферменты используются для расщепления сложных полисахаридов. Рост биомассы *Trichoderma* на кормовом субстрате (ферментативная обработка) делает корма более богатыми белками, вследствие чего они легко усваиваются животными (Dhiman *et al.*, 2002). Таким образом, любое растительное сырье и его производные (как лигноцеллюлозный источник) доступны для превращения ферментными препаратами *Trichoderma* в углеводно-белковые корма и кормовые добавки. Также было показано, что в процессе биоконверсии в некондиционных компонентах растительного сырья, уничтожается болезнетворная микрофлора (Алимова и др., 2007).

В 80-х годах XX века был разработан препарат «Econasa» (Galante *et al.*, 1998), приготовленный из ферментов *T. reesa*, используемый в птицеводстве. Также было показано, что в препаратах, основанных на ферментах *Trichoderma*, ферменты лучше работают в кислых условиях, что делает их более эффективными в верхних отделах 12-перстной кишки. Некоторые ферменты начинают свое действие при ферментации кормов, а потом продолжают свою работу в пищеварительном тракте животных, облегчая тем самым процесс пищеварения у животных. Наиболее применяемым препаратом на сегодняшний день в России, обладающим целлюлозно-пектиназно-ксилазаназным ферментным комплексом, является целловиридин Г 20 X и целловиридин 5000, получаемые культивированием *T. reesa*. В России выпускаются следующие ферментные препараты на основе *Trichoderma* для сельского хозяйства и предприятий животноводства: «Амилосубтилин Д 3х», «Целловиридин Д 3х» и «Целловиридин ВГ 20 X» (Алимова и др., 2007).

1.1.2.3. Применение в медицине

В медицине энзимы грибов рода *Trichoderma* могут быть особенно полезны, так как они имеют сильнейшую фунгицидную активность и высокий уровень синергизма с широко применяемыми противогрибковыми лекарствами. По сравнению с другими хитинолитическими ферментами эндохитиназы *Trichoderma* являются самыми активными противогрибковыми литическими агентами. Ферменты *Trichoderma* способны разрушать не только нежные молодые гифы, но и грубые, содержащие много хитина внешние гифы, конидии и склероции, что может быть использовано для создания новых противомикробных лекарственных средств (Kubisek *et al.*, 2001). Ферменты из *Trichoderma* могут быть также использованы для получения протопластов грибных и растительных клеток. Учитывая их высокую фунгицидную активность, хитинолитические ферменты грибов рода *Trichoderma* могут использоваться и как компонент дезинфицирующих стерилизующих растворов. Показано, что *T. polysporum* продуцируют липофильный циклоспорин А, проявляющий различные биологические и физиологические действия: антимикробное, антипаразитическое, фунгицидное, противовоспалительное и иммуносупрессивное. Так, циклоспорин А используется в качестве иммуносупрессора после трансплантации органов, а также при лечении некоторых аутоиммунных нарушений, таких как псориаз, атопический дерматит, болезнь Бесета. При этом в качестве побочного эффекта наблюдается стимуляция процессов оволосенения. (Kinghorn and Turner, 1992).

Кроме того, ферменты из этого гриба нашли применение в качестве пищевой добавки, лекарственного средства для лечения желудочно-кишечных дисфункций у людей и животных (Takahashi and Kamimura, 2001).

Известно свыше 100 метаболитов, продуцируемых грибами рода *Trichoderma*, которые проявляют высокую антимикробную активность (Harman *et al.*, 2004). Среди этих метаболитов выявлены: харзиановые кислоты, аламетицины, трихолин, пептаиболы, глиотоксин и виридин. (Harman *et al.*, 2004).

1.2. Оксидазы L-аминокислот

Оксидазы L-аминокислот (**L-ОАК**) (КФ 1.4.3.2) – это флавинсодержащие ферменты, характерной особенностью которых является высокая стереоспецифичность по отношению к L-изомерам аминокислот. Эти ферменты представляют особый интерес для научных исследований, а также для промышленности и медицины (Holme and Goldberg, 1975; Березов и др., 1987; Смирнова и Березов, 1987, 1989; Niedermann and Lerch, 1990; Hashmi and Anders, 1991; Rui *et al.*, 1994; Vyfield *et al.*, 1994; Ярошик и Дихтярев, 1995; Bockholt *et al.*, 1995; Murthy and Janardanasarma, 1999). Из группы оксидаз L-аминокислот наибольший интерес в промышленности и медицине представляют L-лизин- α -оксидаза и L-глутамат оксидаза. Оксидазы L-аминокислот катализируют окислительное дезаминирование L-аминокислот с образованием пероксида водорода и соответствующей α -иминокислоты. Иминокислота далее неферментативно гидролизуется до α -кетокислоты и иона аммония (рис. 1).

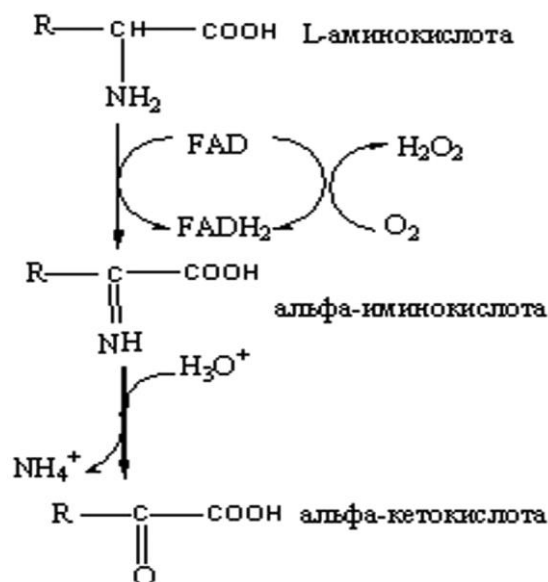


Рис. 1. Схема реакции, катализируемой оксидазами L-аминокислот (Лукашева и др., 2012)

Специфический субстрат ЛО, L-лизин, - незаменимая для человека и животных аминокислота, обладающая рядом уникальных функций, реализуемых на уровне ферментативного катализа, а также синтеза коллагена и гистонов.

Области применения этого фермента на практике довольно обширны. ЛО можно использовать для определения концентрации L-лизина при промышленном производстве этой аминокислоты. Этот фермент также можно применять при исследовании процессов транспорта аминокислот при синтезе белка (Березов и др., 1987; Хадуев и др., 1988; Лукашева и Березов, 1988; Смирнова и Березов, 1989; Потапова и др., 1992; Лукашева и др., 1993, 1997). Другая область применения ЛО – разделение рацематов D- и L-форм лизина. Используя специфичность действия фермента по отношению к L-форме, разделение рацемической смеси можно существенно упростить, так как образующаяся L-кето- α -аминокапроновая кислота может быть легко выделена из смеси с D-лизином (Kusakabe *et al.*, 1980; Ярошик и Дихтярев, 1995). Кроме того, установлено, что исключение лизина из диеты животных с перевиваемыми опухолями приводит к существенному торможению роста опухолей и увеличению продолжительности жизни. Этот факт, а также необратимость реакции окислительного дезаминирования L-лизина при введении в организм животных ЛО, открывает новую перспективную область ее применения - энзимотерапия опухолевых заболеваний (Ярошик и Дихтярев, 1995).

1.2.1. Строение L-ОАК

Чаще всего L-ОАК по строению являются димерными гликопротеинами, состоящими из двух идентичных субъединиц, каждая из которых прочно, хотя и не ковалентно связана с молекулой кофермента (Du and Clementson, 2002). L-ОАК из различных источников содержат ФАД в качестве кофермента, за исключением нескольких L-ОАК, которые содержат ФМН (Souza *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 1988). На спектре оптического поглощения L-ОАК имеют максимумы при 380 и 465 нм, характерные для ФАД-зависимых ферментов (Massey and Curti, 1967).

В литературе имеются немногочисленные сообщения о проявлении ферментативной активности L-ОАК, выделенных из яда змей в мономерной форме: L-ОАК щитомордника (*Agkistrodon halys blomhoffii*) (Takatsuka *et al.*, 2001), хабу (*Trimeresurus flavoviridis*), гадюки Рассела (*Daboia russelli russelli*) (Abe *et al.*, 1998). Интересно отметить, что L-ОАК, обнаруженные в тканях и чернилах у морских зайцев (моллюсков), имеют также мономерное строение (Iijima *et al.*, 2003; Butzke *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Однако большинство L-ОАК функционально активны в димерной форме (Du and Clementson, 2002).

Имеются данные о пространственной структуре фермента L-ОАК из яда щитомордника малайского (*Calloselasma rhodostoma*), полученные методом рентгеновской кристаллографии высокого разрешения (рис. 2) (Pawelek *et al.*, 2000; Лукашева и др., 2012).

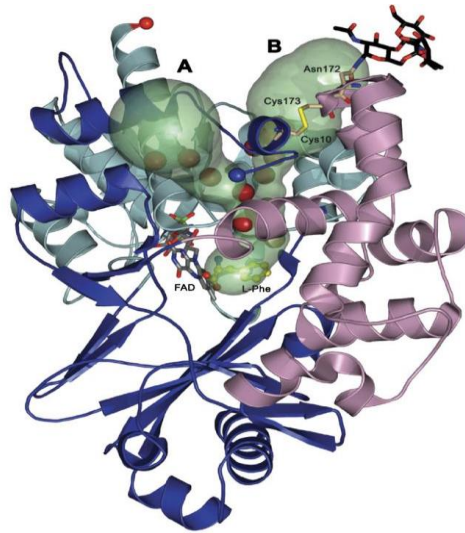


Рис. 2. Схема молекулы L-OAK из *Calloselasma rhodostoma* (Лукашева и др., 2012)

Согласно этим данным, L-OAK представляет собой компактный глобулярный белок, состоящий, в основном, из α - и β -структур, с доминирующей конформацией α -спиралей. Исследования структуры фермента подтвердили, что функционально L-OAK из этого источника является димером. Каждая субъединица включает три части: ФАД-связывающий домен, субстратсвязывающий домен и домен с доминированием α -спиралей. Конформация фермента такова, что активный центр спрятан внутри молекулы: он расположен в основании длинного канала протяженностью около 25 Å вглубь от поверхности молекулы белка (рис. 2) (Moustafa *et al.*, 2006).

Фауст с соавторами (Faust *et al.*, 2007) представили данные о кристаллической структуре L-OAK из грамположительной аэробной неспорообразующей бактерии *Rhodococcus opacus*. Фермент, в противоположность L-OAK из *Calloselasma rhodostoma*, не содержит канала, ориентирующего субстрат к активному центру, чем, по-видимому, объясняется его более широкая субстратная специфичность (Geueke and Hummel, 2002).

Значительное сходство в строении L-OAK из различных источников чаще всего обнаруживалось в ФАД-связывающем домене. Сходные структурные особенности были выявлены также с оксидазами D-аминокислот (D-OAK), выделенными из почки свиньи и из дрожжей *Rhodotorula gracilis*, а также с моноаминоксидазой (MAO), полиаминоксидазой (ПАО) и белками семейства GR₂ (семейство флавинзависимых оксидоредуктаз), что свидетельствует о возможной эволюционной связи этих ферментов. Стоит отметить, что в отличие от оксидаз L-аминокислот, D-OAK, ПАО и MAO не содержат в своей структуре спирального домена. Спиральные же домены L-OAK из *Calloselasma rhodostoma* и L-OAK из *Rhodococcus opacus* заметно отличаются, что отражается в образовании димерной структуры. Кроме того,

структурные различия D-OAK от L-OAK могут быть объяснены часто встречающимися углеводными компонентами в их молекулах.

1.2.2. Распространение L-OAK в природе

L-OAK широко представлены в природе: они обнаружены у многих видов змей (Tan and Swaminathan, 1992; Ponnudurai *et al.* 1994; Ahn *et al.*, 1997; Souza *et al.* 1999; Du and Clementson, 2002), насекомых (Ahn *et al.*, 2000), некоторых видов бактерий (Duerre and Chakrabarty, 1975; Böhmer *et al.*, 1989; Braun *et al.*, 1992; Brearley *et al.*, 1994; Bockholt *et al.*, 1995; Geueke and Hummel, 2002; Mai-Prochnow *et al.*, 2008), грибов (Kusakabe *et al.*, 1980; Niedermann and Lerch, 1990; Nuutinen and Timonen, 2008; Singh *et al.*, 2009), водорослей (Ito *et al.*, 1987; Piedras *et al.*, 1992), моллюсков и рыб (Takamatsu *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2000; Ehara *et al.*, 2002; Butzke *et al.*, 2005; Kitani *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2008). У млекопитающих L-OAK выделены из печени, почек, мозга (Nakano and Danowski, 1966; Murthy and Janardanasarma, 1999), секрета молочных желез (у мышей) (Sun *et al.*, 2002) и из полиморфноядерных лейкоцитов (Marlene *et al.*, 1971). До недавнего времени основным и единственным источником получения этих ферментов был дорогостоящий змеиный яд (Chen *et al.*, 1971; Hu *et al.*, 1982; Oron *et al.*, 1982; Umana, 1982; Ueda *et al.*, 1988; Tan and Saifuddin, 1989; Sanchez and Magalhaes, 1991; Tan and Swaminathan, 1992; Ponnudurai *et al.*, 1994). Однако активный поиск надежных и дешевых источников оксидаз L-аминокислот привел к обнаружению продуцентов этих ферментов среди грибов и бактерий. Продуценты эукариотического происхождения были обнаружены среди пиреномицетов (*Neurospora crassa*), дейтеромицетов (Sikora and Marzluf, 1982; Niedermann and Lerch, 1990) и почкующихся дрожжей (Pollegioni *et al.*, 1993), а прокариотического происхождения — среди бактерий (Chen *et al.*, 1971; Duerre and Chakrabarty, 1975; Koyama, 1984; Nakashima *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2010) и цианобактерий (Pistorius and Voss, 1980; Bockholt *et al.*, 1995).

В зависимости от продуцента, L-OAK различаются по своим ферментативным и биохимическим признакам: молекулярной массе, каталитическим свойствам, а также по особенностям регуляции их синтеза в организме. Существенные отличия аминокислотных последовательностей в молекулах L-OAK из различных источников свидетельствуют о том, что в ходе эволюции от предполагаемого белка-предшественника эти ферменты подвергались значительным изменениям (Du and Clementson, 2002).

1.2.3. Физико-химические свойства L-OAK

Молекулярная масса большинства полученных в гомогенном состоянии ферментов, определенная с помощью метода гель-фильтрации или электрофоретически в нативных

условиях, составляет около 100–150 кДа, масса субъединиц 50–70 кДа при анализе методом электрофореза в денатурирующих условиях (Du and Clementson, 2002).

Изоэлектрическая точка L-ОАК лежит в достаточно широком диапазоне pH - от 4,35 (*T. viride*) до 8,12 (*Naja naja kaouthia*) (Kusakabe *et al.*, 1980; Tan and Swaminathan, 1992).

В субстратной специфичности L-ОАК, выделенных из различных источников выявлены значительные отличия. Изучение активности ферментов преимущественно проводилось методом, сопряженным с использованием пероксидазы. Субстратами для большинства ферментов, выделенных из яда змей, являются гидрофобные и ароматические L-аминокислоты, такие как L-лейцин, L-фенилаланин, L-изолейцин (Pessatti *et al.*, 1995; Mac Heroux *et al.*, 2001; Du and Clementson, 2002; Tonismag *et al.*, 2006). L-ОАК королевской кобры (*Ophiophagus hannah*), активная по отношению к гидрофобным аминокислотам, активна также по отношению к L-лизину и L-орнитину (Tan and Saifuddin, 1989; Jin *et al.*, 2007). L-ОАК лейкоцитов человека (P4i1) проявляла высокую активность в отношении гидрофобных аминокислот и, в частности, она активно окисляла ароматические L-аминокислоты: фенилаланин, тирозин и триптофан (Mason *et al.*, 2004).

Бактериальная L-ОАК, выделенная из *Rhodococcus opacus*, катализирует превращение практически всех L-аминокислот, входящих в состав белков, за исключением L-глицина, L-пролина и L-треонина (Geueke and Hummel, 2002). Такое поведение фермента и связанная с этим широкая субстратная специфичность, как уже указывалось выше, объясняется строением активного центра фермента.

В противоположность бактериальным L-ОАК узкую субстратную специфичность и активность преимущественно по отношению только к L-лизину проявляют ферменты, выделенные из рыб и других морских организмов: *Sebastes schlegelii* – SSAP (Kitani *et al.*, 2008), *Aplysia californica* – Escapin (Ko *et al.*, 2008), *Aplysia punctata* – APIT (Butzke *et al.*, 2005), *Chub mackerel* – AIP (Murakawa *et al.*, 2001), *Myoxocephalus polyacanthocephalus* – MPLAO3 (Nagashima *et al.*, 2009), а также из различных штаммов грибов рода *Trichoderma* (Kusakabe *et al.*, 1980; Лукашева, Березов, 1988, 2002).

1.2.4. Биологические свойства L-ОАК

За последние 10–15 лет L-ОАК стали предметом интенсивного изучения в силу их широкого биологического действия. В частности, были обнаружены бактериостатические, бактерицидные, противогрибковые, противопротозойные, противовирусные, антипролиферативные и противоопухолевые свойства этих ферментов, а также неоднозначное влияние на агрегацию тромбоцитов (Chen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

1.2.4.1. Антибактериальные, противовирусные и антипротозойные свойства L-ОАК

Антибактериальные свойства впервые были показаны у L-ОАК из яда гремучника ромбического *Crotalus adamanteus* (Skarnes, 1970) (таблица 1).

Таблица 1. Антибактериальные, противовирусные и антипротозойные свойства оксидаз L-аминокислот из различных источников

№	Источник L-ОАК	Вид, в отношении которого L-ОАК проявляет активность	Ссылка
1.	Яд куфии <i>Trimeresurus jerdonii</i>	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2002)
2.	Яд ботропса полулунного <i>Bothrops alternatus</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	(Stabeli <i>et al.</i> , 2007)
3.	Яд гюрзы <i>Vipera lebetina</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i>	(Tonismagi <i>et al.</i> , 2006)
4.	Яд каскавеллы <i>Crotalus durissus cascavella</i>	<i>S. mutans</i> , <i>Xanthomonas axonopodis pv passiflorae</i>	(Toyama <i>et al.</i> , 2006)
5.	Слизь с поверхности тела гигантской африканской улитки <i>Achantina fulica Férussac</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	(Otsuka-Fuchino <i>et al.</i> , 1992; Ehara <i>et al.</i> , 2002)
6.	Чернила морского зайца <i>Aplysia californica</i>	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Vibrio harveyi</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2005)
7.	Слизь морского окуня <i>Sebastes schlegelii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Photobacterium damsela subsp. Piscicida</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(Kitani <i>et al.</i> , 2008)
8.	Слизь камбалы звездчатой <i>Platichthys stellatus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , в т.ч. метициллин- устойчивые	(Kasai <i>et al.</i> , 2010)
9.	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Rifai</i>	ВИЧ, вирусы генитального и простого герпеса	(Смирнова и др., 1998, 1999; Пат. РФ № 2022012)
10.	Яд китайской зеленой древесной куфии <i>Trimeresurus stejnegeri</i>	ВИЧ	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)
11.	Яд жарараки <i>Bothrops jararaca</i>	Вирус Денге	(Sant'Ana <i>et al.</i> , 2008)
12.	Яд <i>Bothrops pirajai</i>	Промастиготы различных видов <i>Leishmania</i>	(Izidoro <i>et al.</i> , 2006)
13.	Яд <i>Bothrops moojeni</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(Franca <i>et al.</i> , 2007)

Позже было показано, что L-ОАК, содержащиеся в яде змей, обладают антибактериальными, противовирусными активностями (Lu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003;

Stabeli *et al.*, 2004; Tõnismaägi *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2006; Sant'Ana *et al.*, 2008) и антипротозойными активностями (Izidoro *et al.*, 2006; Franca *et al.*, 2007). L-OAK, обнаруженные в слизи и чернилах моллюсков (морских зайцев, гигантской африканской улитки *Achantina fulica Féruccac*) и слизи некоторых морских рыб, также проявляли антибактериальные свойства (Otsuka-Fuchino *et al.*, 1992; Ehara *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Kitani *et al.*, 2008; Kasai *et al.*, 2010) (таблица 1).

Показан противовирусный эффект против вируса иммунодефицита человека, а также установлено ингибирующее действие в отношении репродукции вируса простого герпеса первого типа (HSV-1) *in vitro* фермента L-OAK из *T. harzianum* Rifai (Пат. РФ, № 2022012), Сделано предположение, что антивирусная активность этого фермента реализуется внутри клетки, поскольку ингибируется синтез не только поверхностных гликопротеинов HSV-1, но и нуклеокапсидных, а также ДНК-связывающих белков вируса простого герпеса (Смирнова и др., 1998). Дальнейшие исследования различных лекарственных свойств ферментов этой группы в экспериментах *in vivo* позволили установить выраженную активность в отношении образования вирусных антигенов как HSV-1, так и HSV-2 (Смирнова и др., 1999).

1.2.4.2. Антипролиферативные и противоопухолевые свойства L-OAK

Наилучшие результаты по антипролиферативной активности L-OAK были получены на первичных опухолях животных. Показано *in vivo*, что эти ферменты обладают широким спектром антиопухолевого действия, что делает их перспективными в химиотерапии опухолей (Смирнова и др., 1996, 2001). Цитотоксический эффект L-OAK был продемонстрирован на различных моделях опухолей животных и человека: саркоме S180, раке молочной железы SKBR-3, асцитной опухоли Эрлиха EAT (Izidoro *et al.*, 2006), Т-лимфобластной лейкемии Jurkat (Izidoro *et al.*, 2006; Ande *et al.*, 2006) и C8166 (Zhang *et al.*, 2003), промиелоцитарном лейкозе человека HL-60 (Torii *et al.*, 1997, Souza *et al.*, 1999), карциноме шейки матки HeLa (Kanzawa *et al.*, 2004, Zhang and Wei, 2007), глиоме (Sun *et al.*, 2003), карциноме яичников человека A2780 (Torii *et al.*, 1997), Т-клеточном лейкозе мышей EL-4 (Iijima *et al.*, 2003), хроническом миелолейкозе человека K562 (Samel *et al.*, 2006).

Таким образом, широкий спектр различных видов фармакологической активности оксидаз L-аминокислот, несомненно, демонстрирует большие перспективы использования этих ферментов в качестве лекарственных средств, особенно в онкологии.

1.2.5. Применение L-ОАК в медицине

Начиная с середины прошлого столетия некоторые ферменты привлекают особое внимание исследователей благодаря перспективе их использования в медицинских целях, в частности, в онкологии. К настоящему времени известно около 20 противоопухолевых ферментов (Лукашева и др., 2012), показавших активность в опытах на трансплантируемых опухолях животных. К ферментным препаратам предъявляется при этом, ряд определенных требований. Они должны легко проникать через мембраны клеток, обладать низкой аллергенностью и иммуногенностью, высокой стабильностью при физиологических условиях среды (рН и температуре), а также большим периодом полужизни и медленно выводиться из организма. Сочетание этих требований, невозможность всегда получать ферменты из непатогенных микроорганизмов и зависимость ферментативных препаратов от добавления эндогенных кофакторов (в том числе, коферментов), ограничивает перспективу использования многих противоопухолевых средств. В настоящее время в онкологической практике широко применяется только один фермент – L-аспарагиназа, в основном, для лечения острых лимфобластных лимфолейкозов, лимфогрануломатозов, лимфо- и ретикулобластом. Налажен промышленный выпуск этого фермента во многих странах, но не в России. Среди перспективных противоопухолевых ферментов, кроме L-аспарагиназы (Березов, 2005; Лукашева и др., 2012) следует указать L-глутамин(аспаранин)азу, L-метионин- γ -лиаза и ЛО (Pokrovsky *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2017).–

В таблице 2 в сравнительном аспекте представлены характеристики этих ферментов. Все указанные в таблице ферменты тормозят синтез ДНК, РНК и белка в клетках опухолей.

Таблица 2. Характеристики перспективных противоопухолевых ферментов

Фермент	Число оборотов, Моль/мин × моль/Е	Период полужизни, час	Антиопухолевая активность, E/ <i>in vitro</i>
L-аспарагиназа	1000	2-4	2800
L-глутамин(аспаранин)аза	2800	13	150-480
L-метионин- γ -лиаза	700	4	0,1-1,0
L-лизин- α -оксидаза	7200	2	0,1-1,0

Наиболее перспективными с точки зрения антиопухолевой активности, являются L-метионин- γ -лиаза (El-Sayed, 2010) и L-лизин- α -оксидаза. Но L-метионин- γ -лиаза по

кинетическим свойствам (число оборотов), а также по спектру чувствительных опухолей в настоящее время уступает ЛО (Березов, 2005).

В таблице 3 представлен спектр противоопухолевых активностей L-аспарагиназы и ЛО. Следует отметить, что спектр противоопухолевого действия ЛО гораздо шире, чем у аспарагиназы. Кроме того, ЛО проявляет антилейкозную активность и антиметастатический эффект *in vivo* при более низких эффективных дозах. При 2-х-кратном введении ЛО через 8 ч или 5-ти-кратном ежедневном введении в диапазоне разовых доз 70 Е/кг (курсовая доза соответственно 350 Е/кг) наблюдается увеличение продолжительности жизни на срок от 34 до 48% от времени жизни нелеченных животных (Лукашева и др., 2006).

Кроме того, в отличие от аспарагиназы для ЛО был показан антиметастатический эффект в опытах на мышинной опухоли легких Льюиса. Отмечено снижение количества метастазов в 3-4 раза и объема первоначальной опухоли в 10 раз (Pokrovsky *et al.*, 2017; Березов, 2005).

Таблица 3. Противоопухолевые активности L-аспарагиназы и L-лизин- α -оксидазы

Фермент	Опухоли мышей							Опухоль крыс W-256	
	Гемобластозы		Лимфолейкоз	Асцитная гепатома 22А	Аденокарциномы		Меланома В-16		
	L-5168	L-1210			Са-755	АКАТО Л			
									Р-388
L-аспарагиназа	–	–	+++	–	–	–	+	–	+
L-лизин- α -оксидаза	++	++	–	+++	+++	++	++	++	–

Помимо противоопухолевого действия выявлена эффективность ЛО против вируса герпеса простого и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ – инфекции). Был получен явный тормозящий эффект фермента как на продукцию, так и на экспрессию некоторых вирусных антигенов (Березов, 1997).

Следует отметить, что ЛО является более специфичным анти-ВИЧ агентом, чем стандартный широкоприменяемый азидотимидин. Для антивирусного действия требуется примерно в 1500 раз меньшие концентрации, чем азидотимидина (Березов, 1997; 2005).

Таким образом, преимущества ЛО перед другими противоопухолевыми ферментами очевидны. Представленные выше данные являются основанием для проведения работ по получению ЛО как лекарственного препарата и дальнейших исследований его противоопухолевого действия.

1.2.6. Механизмы биологических эффектов L-ОАК

1.2.6.1. Механизмы биологического действия, связанные с образованием активных форм кислорода (АФК)

В многочисленных исследованиях было показано, что биологическое действие L-ОАК связано с образованием пероксида водорода в катализируемой ими реакции (Kusakabe *et al.*, 1980; Torii *et al.*, 1997; Takamatsu *et al.*, 1999; Iijima *et al.*, 2003; Kitani *et al.*, 2008; Ciscotto *et al.*, 2009; Nagashima *et al.*, 2009). В присутствии каталазы, известного фермента, разрушающего пероксид водорода, было показано как уменьшение, так и полное исчезновение цитостатического действия L-ОАК. Так, эффект L-ОАК на опухолевые клетки С8166 снижался в 16 раз в присутствии каталазы, но не исчезал полностью (Zhang *et al.*, 2003).

Цитотоксическое влияние ЛО из *T. viride* Y-244 также снижалось при добавлении в среду каталазы (Kusakabe *et al.*, 1980). На примере фермента из моллюска *Achacina* было показано, что антибактериальная активность L-ОАК тоже связана с образованием пероксида водорода и устраняется добавлением в среду каталазы (Ehara *et al.*, 2002).

Кроме того, схожие данные были получены с ферментом ЛО, выделенным из бактериального штамма *Rheinheimera* sp. GR5. В средах, содержащих L-лизин, фермент проявлял антимикробную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей, водорослей, этот эффект также снимался добавлением экзогенной каталазы, как и в случае фермента из *Achacina* (Chen *et al.*, 2010).

Пероксид водорода, являясь активной формой кислорода, способен вызывать повреждение ДНК и гибель клетки как в результате некроза, так и в результате апоптоза (López-Lázaro, 2007). Эти механизмы гибели клеток сопровождаются набором характерных биохимических и цитологических изменений. В роли генетических индукторов апоптоза, срабатывающих в ответ на рецепторный сигнал, могут выступать гены Fas/APO-1-семейства: с-мус, мах, р53, ced-3 и др. Продукт гена Fas – клеточный рецептор CD95, мишень белка Fas-лиганда – «сигнала смерти». Подавление экспрессии некоторых генов, например, семейства Bcl-2, также вызывает апоптоз. К настоящему времени детальное изучение механизмов, с помощью которых продукты этих генов запускают или сдерживают апоптоз, не закончено. Однако уже выяснено, что они могут усиливать образование активных кислородных радикалов, таких как белок APO-1,

гомологичный рецептору фактора некроза опухолей. Показана также регуляция этими генами переноса кальция в цитоплазму (как продукт гена *Bcl-2*), регуляция активности нейтральных протеаз цитозоля (как продукт гена *ced-3*), а также регуляция связывания с ДНК (как димер белков *muc-max*) (Зайчик и др., 2008).

При действии пероксида водорода на клетки образуются и другие активные формы кислорода (АФК), что приводит к изменению трансмембранного потенциала митохондрий. В условиях умеренного повреждения клетки в отсутствие гипоксии происходит уменьшение трансмембранного потенциала митохондрий. Но если антиоксидантные системы клетки не компенсируют сдвига редокс-потенциала, процесс прогрессирует. При условии отсутствия выраженного энергодифицита и сохранности генетического аппарата гибель клетки реализуется путем апоптоза, но глубокая гипоксия и выраженные повреждения ДНК инициируют некробиоз. При развитии апоптоза АФК изменяют условия взаимодействия кальция с кальмодулином и способствуют нарастанию цитоплазматической и внутриядерной активности кальция (а при блокаде гена *Bcl-2* – и росту его внутриклеточной концентрации).

В 1996 г. было установлено, что компонентом змеиного яда, вызывающего апоптоз, являются именно L-OAK (Suhr and Kim, 1996). Позднее были получены и другие сведения о способности L-OAK вызывать апоптоз, например, клеток лимфолейкоза мышей, T-лимфобластной лейкемии человека (Suhr and Kim, 1996, 1999), а также клеток промиелоцитарной лейкемии человека и почки человека (Torii *et al.*, 1997). ОНАР-1 (L-OAK из *T. flavoviridis*) способна индуцировать апоптоз в клетках глиом крыс C6 и человека RBR17T, U251 (Sun *et al.*, 2003). Антиоксиданты – каталаза и восстановленная форма глутатиона – ингибировали проапоптотический эффект ОНАР-1. Было показано, что в присутствии ОНАР-1 увеличивалась экспрессия белка p53 (медиатора апоптоза, связанного с действием стресса, в том числе вызванного пероксидом водорода). На основании этих данных авторы сделали вывод о способности L-OAK, посредством образования пероксида водорода вызывать апоптоз через экспрессию белка p53 в клетках глиомы.

В 2007 г. L. Zhang и L. Cui показали, что под действием АСТХ-6 (L-OAK из яда *A. acutus*) в клетках рака легких линии A549 увеличивается количество АФК, причем каталаза ингибировала как образование АФК, так и запуск апоптоза (Zhang and Cui, 2007). Авторы также продемонстрировали, что АСТХ-6 индуцирует апоптоз за счет индукции экспрессии белков Fas и FasL, а также c-Jun/JNK, которые играют важную роль не только в запуске запрограммированной гибели, но и участвуют в регуляции процессов дифференцировки и пролиферации клетки. Так, Fas (поверхностный белок, рецептор ФНО) индуцирует гибель клеток путем связывания с Fas–лигандом (FasL). C-Jun оказывает существенное влияние на

пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, а с-Jun-NH₂ – терминальная протеинкиназа (JNK), также известная как стресс-активируемая протеинкиназа, регулирует эти процессы путем фосфорилирования с-Jun. Кроме того, продемонстрированное авторами участие каспаз 8 и 9 в индуцированном АСТХ-6 апоптозе говорит о вовлеченности в эти события и митохондриального пути. Повышение активности каспазы-3 и каспазы-9 (митохондриальный путь) наблюдалось также при действии выделенной из *B. atrox* L-ОАК на клетки HL-60 (Alves *et al.*, 2008).

Таким образом, результаты опытов, полученные на различных биологических системах с использованием L-ОАК из разных источников, свидетельствуют о том, что процессы апоптоза, вызываемые АФК, в частности, пероксидом водорода, действительно важны и, возможно, лежат в основе проявления биологической активности рассматриваемой группы ферментов.

1.2.6.2. Биологическое действие L-ОАК, связанное с молекулярными механизмами, не включающими действие АФК

В настоящий момент известно достаточно много биологических эффектов L-ОАК, которые необъяснимы действием пероксида водорода. Например, добавление каталазы приводило к значительному, но не полному уменьшению цитотоксичности L-ОАК из *A. fulica* на клетки HeLa (Kanzawa *et al.*, 2004), однако одновременное добавление пероксида водорода и каталазы не влияло на выживаемость клеток.

При сравнительном исследовании цитотоксического действия L-ОАК из яда *Agkistrodon halys* и экзогенно добавленного пероксида водорода обнаружено (Suhr and Kim, 1999), что механизм индукции апоптоза этими агентами различен, что указывает на включение механизмов апоптоза, не связанных с образованием АФК.

При изучении анти-ВИЧ свойств L-ОАК из яда куфии *Trimeresurus stejnegeri in vitro* (Zhang *et al.*, 2003) в случае замены анти-ВИЧ фермента пероксидом водорода активность отсутствовала, и более того, наблюдалось даже незначительное увеличение экспрессии вируса. Таким образом, механизм биологического действия L-ОАК в данном случае не связан с одним только фактором, действия пероксида водорода.

При инкубации L-ОАК из яда щитомордника малайского *Calloselasma rhodostoma* с клетками Т-лимфобластной лейкемии Jurkat в последних наблюдались изменения, характерные для некротической гибели: нарушение целостности митохондрий с падением мембранного потенциала и нарушение метаболизма клетки, приводящее в итоге к лизису (Ande *et al.*, 2006). Внесение каталазы не устраняло полностью цитотоксические эффекты L-ОАК, но тип деструкции клетки носил признаки апоптоза, что подтверждалось не только характерными морфологическими изменениями в клетке, но также защитным действием известного

ингибитора каспаз zVAD-fmk и экспрессией гена Bcl-2. В той же работе было показано, что инкубирование D-ОАК (ферментов, катализирующих аналогичную реакцию превращения D-изомеров аминокислот) с клетками Jurkat также снижало выживаемость клеток, вызывая некротическую гибель. Но добавление каталазы при этом полностью устраняло цитотоксический эффект D-ОАК. Полученные данные подтверждают присутствие у L-ОАК дополнительного механизма цитотоксического действия, не связанного с выделением пероксида водорода.

1.2.6.3. Механизмы биологического действия L-ОАК, связанные с истощением запасов свободных аминокислот

Механизм апоптотического действия L-ОАК, связанный с истощением запасов свободных аминокислот, был продемонстрирован следующим образом (Kanzawa *et al.*, 2004). Клетки HeLa, предварительно инкубированные в течение 48 ч с *Achacin* (L-ОАК из *Achacina fulica*) и отмытые от фермента, погибали путем апоптоза, а клетки, инкубированные в среде, обедненной предпочтительным субстратом *Achacin* (Арг, Лей, Лиз, Мет, Фен и Трп), погибали при морфологических изменениях, характерных для индуцированного *Achacin* апоптоза.

АIP был способен индуцировать апоптоз в клетках HL-60 даже в присутствии антиоксидантов, хотя и более медленно (Murakawa *et al.*, 2001). Кроме того, клеточные линии HP100-1 (сублиния HL-60, резистентная к пероксиду водорода), также подвергались апоптозу, что доказывает связь индукции апоптоза с отсутствием в среде свободных аминокислот. Добавление к среде культивирования L-лизина, лучшего субстрата АIP, приводило к полному ингибированию апоптоза. Эти результаты подтверждают мнение о том, что истощение запасов аминокислот может инициировать развитие апоптоза.

На принципе исключения из среды свободной аминокислоты основано действие известного фермента L-аспарагиназы, широко используемого в химиотерапии некоторых видов лейкозов. L-аспарагиназа относится к классу гидролаз и, преимущественно, катализирует гидролиз L-аспарагина.

Однако и механизм, связанный с истощением запасов свободных аминокислот, не объясняет результаты всех экспериментов, где наблюдалось апоптотическое действие L-ОАК. Внесение свободных аминокислот не предотвращало гибель клеток в среде, предварительно инкубированной с L-ОАК из *Calloselasma rhodostoma* (Aude *et al.*, 2006). Ингибирование апоптоза в эксперименте могло быть достигнуто лишь добавлением фетальной телячьей сыворотки, что свидетельствует о неизвестных пока факторах цитотоксичности L-ОАК.

С использованием радиоактивных изотопов *in vitro* было показано, что ЛО подавляет синтез ДНК, РНК и белка в клетках мышинового лимфоаденоза Фишера L-5178Y (Kusakabe *et al.*, 1980), а также карциномы яичников CaOv и лимфомы Беркитта человека (Хадуев и др., 1986, 1987). Методом проточной цитофлуориметрии на клетках лимфомы Беркитта изучено действие ЛО на фазы клеточного цикла и показано, что фермент блокирует переход клеток из фазы S в G₂/M фазу (Жуковский и др., 1987).

Таким образом, ферменты L-ОАК опосредуют свое биологическое действие на клетку прежде всего через образование АФК, выделяющихся в ходе реакции. Кроме того, их действие связано как со свойством прикрепляться к поверхности клетки и создавать локально высокие концентрации пероксида водорода, так и со способностью удалять из среды культивирования эссенциальные, т.е. необходимые для поддержания жизни клетки вещества.

1.2.7. Функциональная роль L-ОАК в живых организмах

Широкий спектр биологического действия ферментов L-ОАК, несомненно связан с выполняемыми ими функциями в живом организме. При исследовании обмена L-лизина в мозге мышей было показано, что единственным путем превращения этой аминокислоты является окислительное дезаминирование α -аминогруппы и последующее образование Δ^1 -пиперидин-2-карбоксилата, что указывает на протекание катаболизма L-лизина в мозге через пипеколиновый путь, ключевую роль в котором играет L-ОАК (Murthy and Janardanasarma, 1999).

L-ОАК, обнаруженная в составе молока мышей (Marlene *et al.*, 1985), обладала сильным антибактериальным действием, что может играть большую роль в предотвращении мастита. L-ОАК, найденная в составе лейкоцитов, образуя пероксид водорода, непосредственно участвует в выполнении лейкоцитами защитных функций.

L-ОАК, входящие в состав яда змеи, чернил морских зайцев и слизи африканской гигантской улитки, играют роль протекторов в защите организмов от внешних агрессивных воздействий, в том числе, инфицирования различными болезнетворными агентами. Протекторное действие описано у L-ОАК из японской скумбрии *Chub mackerel*, которая начинала экспрессироваться в организме рыбы только после инфицирования личинками нематоды *Anisakis simplex* (Murakawa *et al.*, 2001). Фермент, как оказалось, локализован в капсулах, расположенных вокруг личинки, и препятствует проникновению последней в ткани хозяина.

L-ОАК грибов, в частности, рода *Trichoderma*, очевидно, также выполняет защитные функции. При продуцировании в окружающую среду этот белок вместе с другими

внеклеточными ферментами подавляет рост и развитие антагонистических микроорганизмов (Yang *et al.*, 2005).

Функции бактериальных L-ОАК не так ясны, но существует предположение, что продуцируемые ими кето-кислоты способны участвовать в связывании ионов железа и подавлять таким образом процессы жизнедеятельности чужеродных клеток (Geueke and Hummel, 2002).

1.2.8. Способы получения ЛО

Впервые фермент ЛО был открыт японскими учеными в лаборатории профессора К. Soda (Kusakabe *et al.*, 1980). Он был выделен из экстракта гриба *Trichoderma viride*.

Этими же исследователями был показан тормозящий рост эффект ЛО на культуру лейкозных клеток (Kusakabe *et al.*, 1979). С тех пор японские ученые являются мировыми монополистами как по исследовательским работам, так и по производству фермента. Это объясняется, в первую очередь, отсутствием активного штамма-продуцента у других исследователей, который мог бы составить конкуренцию *T. viride*.

Ранее у нас в стране был найден штамм *Trichoderma harzianum* Rifai – продуцент ЛО, обладающий весьма широким спектром биологического действия: антимикробного, антивирусного, включая ВИЧ-инфекцию, иммуномодулирующей и антихламидиозной активностью, а также противоопухолевым, ранозаживляющим и микоплазмостатическим действием (Пат. СССР, № 1044043), и созданы фармацевтические композиции на ее основе (Пат. РФ, № 2002108326 (13) А). Однако следует отметить сравнительно невысокую продуктивность указанного штамма, и то, что удовлетворительная активность композиций отмечается только в присутствии усилителей биологической активности (антиоксиданты, витаминный препарат, иммуномодуляторы и др.).

1.2.9. Выделение и очистка ЛО

Впервые гомогенный препарат ЛО был получен с выходом 8 % и удельной активностью, равной 66 Е/мг японскими учеными из *T. viride* Y-244. Очистка состояла из 8-ми трудоёмких стадий (Kusakabe *et al.*, 1980). Затем российскими исследователями был разработан 4-х стадийный метод выделения с выходом 56% и удельной активностью 31,5 Е/мг. (Пат. СССР, № 1044043). Упомянутые способы очистки не предполагали использования органических растворителей из-за соображение потенциальной экологической опасности. Используемые в обоих случаях процессы очистки были трудоемкими, недостаточно эффективными и, соответственно, дорогими.

Немецкими исследователями был предложен эффективный метод очистки препарата ЛО из гриба *T. viride* i4, обеспечивающий 60 % выход фермента. Степень очистки составляла 300, а удельная активность препарата – 90 Е/мг. Но этот метод осуществлялся с использованием большого количества ацетона – до 60% от объема реакционной среды. При применении ацетона в производственных условиях возникают проблемы экологического характера и техники безопасности на производстве (Weber *et al.*, 1994).

В настоящее время в России практически отсутствует собственное производство противоопухолевых фармакологических средств. Частично проблема решается за счет импорта готовых лекарственных форм. Очевидно, что этот путь не может полностью покрыть потребности отечественного здравоохранения ни по номенклатуре, ни по объему лекарств. Создание лекарственной формы ЛО сдерживается отсутствием высокопродуктивного штамма-продуцента, а также отсутствием эффективных технологий получения фермента.

На мировом рынке монополистом по продаже ЛО является Япония. Цена ЛО из *T. viride* Y244 как химического реактива (не для медицинского применения) фирмы “Sigma” составляет 216 евро за 25 U (меньше 1 мг).

Таким образом, известные методы биосинтеза ЛО и получения гомогенной субстанции не эффективны и не технологичны, что не позволяет получать качественный препарат ЛО в количествах, позволяющих перейти к клиническим испытаниям, а затем к практическому использованию в терапии опухолей. Следовательно, необходимость исследования разработки способа получения ЛО очевидна.

Создание эффективной конкурентоспособной схемы получения ЛО с использованием нового активного штамма-продуцента является ключевым этапом создания лекарственного препарата ЛО.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Микроорганизмы и их культивирование

2.1.1. Отбор активных штаммов-продуцентов ЛО

В процессе поиска активного продуцента использовали 14 музейных штаммов *Trichoderma*, полученных из ВКМ (ИБФМ РАН): *T. harzianum* Rifai ВКМ F-1959, *T. longibrachiatum* Rifai ВКМ F-2025, *T. virens* (J.H. Mill, Giddens & A.A. Foster) Arx ВКМ F-1117, *T. aureoviride* Rifai ВКМ F-2026, F-2027, *T. viride* Pers. ВКМ F-2721, F-1130, F-1132, F-1133, F-1134, F-1135, F-2430, F-2587, *T. koningii* ВКМ F-2429. Кроме того, были протестированы 8 природных штаммов грибов, выделенных из образцов почв поля и лесного массива (г. Пущино). Предварительные исследования (окраска, форма колоний, а также морфологические характеристики) давали основания отнести выделенные штаммы к роду *Trichoderma*.

Для поддержания штаммов *Trichoderma* использовали среду на основе сусло-агара.

Отбор штаммов-продуцентов ЛО проводили на плотных средах: Чапека, мальт-агаре, сусло-агаре, а также на среде, содержащей пшеничные отруби (10%) и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5%) при 28 °С. Выявление штаммов продуцентов осуществляли с помощью орто-дианизидинового теста на наличие пероксида водорода.

2.1.2. Получение накопительных культур

Накопительные культуры потенциальных продуцентов ЛО, выделенных нами из почвы, получали на стерильных пшеничных отрубях (10 г) (несколько пассажей) с последующим рассевом на агаризованной среде, содержащей измельченные отруби (10 %) и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 %). Культивирование проводили при 28 °С.

Для определения способности к биосинтезу ЛО выросшие колонии обрабатывали раствором, содержащим L-лизин (2 мМ), *o*-дианизидин (0,1 мМ) и пероксидазу (5 мкг/мл). Грибы из побуревших колоний далее тестировали на способность к синтезу ЛО в условиях твердофазного культивирования на пшеничных отрубях. Аналогичным образом тестировали и музейные штаммы *Trichoderma* полученные из ВКМ.

Отобранные штаммы также тестировали в условиях погруженного культивирования.

2.1.3. Твердофазное культивирование грибов *Trichoderma* на увлажненных пшеничных отрубях

В колбу объемом 0,75 л, содержащую 10 г сухих стерильных отрубей, вносили 10 мл 5% раствора солей неорганического азота, посевной материал и тщательно перемешивали путем

встряхивания. В качестве источника неорганического азота добавляли в разных вариантах одну из следующих солей: NH_4NO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ («Купавнареактив», Россия).

Культивирование осуществляли при, 28 °С в течение 15 дней при периодическом встряхивании. У выросших культур через определенные промежутки времени проверяли уровень активности ЛО. Для этой цели отруби с выросшим на них мицелием инкубировали при перемешивании на качалке 220 об/мин в трис- HCl буфере (25 мМ, рН 8,0) в течение 60 мин. Осадок удаляли центрифугированием при 6000 г в течение 20 мин, а в супернатанте определяли активность ЛО.

2.1.4. Культивирование грибов *Trichoderma* в погруженной культуре (опыты в колбах)

Грибы культивировали на среде Чапека, содержащей (г/л): NaNO_3 – 4,0; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 («Купавнареактив» Россия), микроэлементы по Буркгольдеру (мг/л): KI – 0,2, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ – 0,1, MnSO_4 – 0,1, ZnSO_4 – 0,1, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5, NaMoO_4 – 0,01). В качестве источника углерода добавляли (%): глюкозу – 5,0, или пшеничный крахмал – 5,0, или сахарозу – 5,0, или глюкозу – 1 и кукурузный экстракт – 1, рН среды 7,2.

Для выращивания грибов использовали также среду на основе пшеничных отрубей (3,0-10,0 г на 100 мл дистиллированной воды). В качестве источника неорганического азота использовали указанный выше набор азотсодержащих солей в концентрациях 2-8 %. (п. 2.1.3).

В качестве субстрата роста использовали также зерна культурных злаковых растений: пшеницы (*Triticum durum*), кукурузы сахарной (*Zea mays*), ржи посевной (*Secale cereale*), проса обыкновенного (*Panicum miliaceum*).

Кроме того, тестировали неочищенные семена диких злаковых, собранных в окрестностях г. Пущино – ежи сборной (*Dactylis glomerata*), мятлика лугового (*Poa pratensis*), вейника наземного (*Calamagrostis epigéjos*), костера безостого (*Bromus inermis*), пырея ползучего (*Elytrigia répens*), овса обыкновенного (*Avena sativa*), ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*).

В культивационные колбы вносили навески мелкоразмолотых семян в количестве по 7 г, после чего в каждую колбу добавляли 100 мл 4 % раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ростовые среды стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин.

После стерилизации в колбы вносили посевной материал в количестве 5 % (об.) и культивировали от 1 до 15 сут на качалке 220 об/мин при 24, 29 или 37 °С. Пробы отбирали каждые 24 ч и измеряли уровень активности и концентрацию ЛО в жидкой фазе.

2.1.5. Оптимизация синтеза ЛО грибом *Trichoderma* в биореакторах лабораторного типа

Влияние аэрации, температуры и pH на биосинтез ЛО изучали в ферментерах усовершенствованной конструкции на основе АНКУМ-2М, сконструированных специально для выращивания мицелиальных грибов (общий объем - 3 л, рабочий объем - 1,5 л). Для предотвращения пенообразования использовали безбарботажную подачу воздуха или механический пеногаситель; pO_2 поддерживали путем регулирования числа оборотов мешалки и подачи воздуха; pH, в случае необходимости, регулировали путем титрования 10%-ными растворами HCl или NaOH.

2.1.6. Получение посевного материала

Для получения посевного материала культуру гриба выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре. Полученную биомассу пересеивали на среду, содержащую 10 г отрубей и 10 мл дистиллированной воды, и наращивали до тех пор, пока поверхность среды не покрывалась мицелием гриба. После 5-6 сут роста отруби заливали 100 мл стерильной дистиллированной воды, инкубировали при перемешивании (на качалке 220 об/мин) в течение 2 ч. Жидкую фазу использовали для засева в количестве 5% к объему реакционной среды.

2.1.7. Определение таксономической принадлежности штамма

Таксономическую принадлежность штамма *Trichoderma* sp. 6 определяли, основываясь на его макро- и микроморфологии при росте на среде Чапека, агаризованном сусле и картофельно-глюкозном агаре (Lieckfeldt *et al.*, 2001; Александрова, 2003). Фотографии *Trichoderma* sp. 6, продуцирующего ЛО, были получены с помощью световой микроскопии (Микроскоп Zeiss Axiovision 200 M, Германия). Также образцы штамма были отправлены в ВКМ с целью установления точной таксономической принадлежности. Точная таксономическая принадлежность была установлена к.б.н. Чигиной Н.И. в ВКМ.

2.2. Измерение активности ЛО

А. Ортоданизидиновый метод

Определение активности ЛО проводили по скорости образования перекиси водорода в 20 mM трис-HCl буфере (pH 8,0) в присутствии *o*-данизида (0,2 mM), пероксидазы (5 мкг/мл) и L-лизина (2 mM) на спектрофотометре «Shimadzu 160» (Япония) ($E_{436}=8,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 мкМ лизина в мин.

Б. Полярнографический метод.

Активность ЛО определяли также по потреблению кислорода с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода Кларка в ячейке с перемешиванием при 22 °С. Использовали препараты фермента в 25 мМ трис-НСl буфере (рН 8,0) в присутствии 2 мМ лизина.

2.3. Выделение ЛО

2.3.1. Осаждение ЛО при помощи сульфата аммония

По окончании процесса ферментации гриба, культуральную жидкость из ферментера, содержащую отруби и мицелий, сливали в стерильные пластиковые бутылки. Для отделения клеток грибов и отрубей от нативного раствора культуральную жидкость центрифугировали при 6000 g в течение 40 мин. Супернатант сливали и насыщали сульфатом аммония до концентрации 25 %. Высаливали побочные белки в течение суток при температуре +5 °С. Затем раствор центрифугировали при 6000 g в течение 40 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант насыщали сульфатом аммония до концентрации 60 %. Высаливали ЛО в течение суток при температуре +5 °С. После формирования осадка измеряли активность фермента в надосадочной жидкости: как только активность падала до нулевых значений, что свидетельствовало о полном переходе ЛО в нерастворимую форму, осадок отделяли центрифугированием при 6000 g в течении 30 мин. Полученный после центрифугирования осадок растворяли в 50 мл трис-НСl буфера (0,025 М, рН 8,0) и далее диализовали против воды в течении 12 ч.

2.3.2. Выделение ЛО методом мембранной ультрафильтрации

Культуральную жидкость отделяли от биомассы центрифугированием при 6000 g. Супернатант переносили в фильтрационную ячейку Amicon Stirred Cell (США) оснащенную мембранным фильтром Diaflo ХМ 150 диаметром пор 150 кДа, т.к. масса нативного фермента ЛО составляет 120 кДа. Этот метод позволяет отделить большую часть балластных белков культуральной жидкости. Фильтрование осуществляли под давлением азота (0,2 атм) при постоянном перемешивании. Полученный фильтрат насыщали сульфатом аммония до 25 %, затем проводили очистку ЛО, используя гидрофобную и ионообменную хроматографию, описанную ниже.

2.4. Очистка ЛО

2.4.1. Очистка ЛО методом гидрофобной хроматографии

В обессоленный препарат фермента после диализа или в материал ЛО после ультрафильтрации, добавляли сульфат аммония до 25 % насыщения (при необходимости центрифугировали при 6000 g в течение 30 мин для удаления нерастворимых белков) и с помощью перистальтического насоса наносили на колонку с октил-сефарозой CL-4B (2 × 20 см), предварительно уравновешенную 25 % сульфатом аммония в трис-НСl буфере (0,025 М, рН 8,0). Затем колонку промывали буфером (100 мл) того же состава. Элюцию фермента проводили при ступенчатом снижении содержания в буфере сульфата аммония, в следующем порядке: 20, 15, 10 и 5 %.

2.4.2. Очистка ЛО методом ионообменной хроматографии

Фракции, полученные после очистки на колонке с октил-сефарозой, объединяли и подвергали диализу в течении 12-15 ч в трис-НСl буфере (0,025 М, рН 8,0). Диализат центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин и наносили на колонку с DEAE Тоурpearl HW-55 (2 x 15 см), уравновешенную трис-НСl буфером (0,025 М, рН 8,0). Колонку промывали тем же трис-НСl буфером (50 мл). Элюцию фермента проводили при ступенчатом повышении содержания в буфере NaCl в следующем порядке: 0,1; 0,15; 0,2; и 0,3 М.

2.5. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд и Лоури (Lowry *et al.*, 1951; Bradford, 1976). В качестве стандарта для калибровочного графика использовали бычий сывороточный альбумин известной концентрации.

2.6. Определение молекулярной массы и гомогенности фермента

2.6.1. Электрофорез в денатурирующих условиях

Разделение белков проводили в 7,5 % ПААГ, используя прибор для электрофореза PROTEAN II xi system фирмы BIO-RAD (США). Электродным буфером служил трис-глициновый буфер, рН 8,3 (25 мМ трис и 192 мМ глицин) с добавлением 0,01 % додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970).

Молекулярную массу денатурированного белка определяли с помощью набора Low Molecular Weight SDS MarkerKit (Sigma) содержащий: β -галактозидазу *E. coli* (116 кДа), бычий сывороточный альбумин (66,2 кДа), альбумин куриного яичного белка (45 кДа), лактат дегидрогеназа (35 кДа), эндонуклеазу рестрикции Bsp. 981 *E. coli* (25 кДа), β - лактоглобулин коровьего молока (18,4 кДа), лизоцим яичного белка (14,4 кДа).

Для лучшего определения сопутствующих минорных белков использовали также более чувствительный метод - окрашивание нитратом серебра. Электрофорез проводили так же, как описано выше. Полученный гель сначала помещали в 12,7 мМ раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ на 1 мин, а затем промывали гель трижды дистиллированной водой и помещали в раствор, содержащий 0,02 % AgNO_3 и 0,075 % формальдегид, и инкубировали 10 мин. Гель вновь промывали дистиллированной водой и помещали в раствор, содержащий 4% Na_2CO_3 , 0,05% формальдегид и 0,01 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и инкубировали до появления полос.

2.6.2. Нативный электрофорез в градиенте ПААГ

Для проведения нативного электрофореза использовали камеру HeliconVE 4. Градиент акриламида (от 10 до 30 %) получали с помощью градиентного смесителя фирмы Pharmacia. Формировали градиент геля от 33 до 5 % снизу-вверх. Затем наносили препарат ЛО, содержащий 25-30 мкг белка с добавлением и 0,001% бромфенолового синего. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере, рН 8,3 (25 мМ трис и 192 мМ глицин) при силе тока 50 мА в течение 10 ч. По окончании электрофореза, гель окрашивали сначала ортодианизидиновым методом. Затем слайд геля прокрашивали Coomassie Blue R250 (как описано выше) для подтверждения отсутствия посторонних белков.

2.6.3. Эксклюзионная хроматография

Определение молекулярной массы фермента также проводили с помощью гель-фильтрации на колонке (1,5 x 95 см) с DEAE Тоурpearl HW-55. Элюцию проводили 0,025 М трис-НСl буфером (рН 7,8). Калибровочная кривая была получена с использованием стандартных белков – алкогольдегидрогеназы (150 кДа), бычьего сывороточного альбумина (67 кДа), α -химотрипсिनогена (25 кДа) и цитохрома *c* (13 кДа). Для определения свободного объема геля в колонке использовали голубой декстран 2000 (Остерман, 1985).

2.7. Определение наличия изоферментов

Для определения наличия изоферментов проводили нативный гель-электрофорез в градиенте ПААГ как описано выше. По окончании электрофореза гель окрашивали ортодианизидиновым методом. Присутствие ЛО определяли по наличию бурых полос на геле.

2.8. Спектральные исследования ЛО

Спектральный анализ фермента проводили на спектрофотометре «Shimadzu-UV160» (Япония) при $\lambda = 240-540$ нм в присутствии и отсутствии L-лизина ($l = 1$ см).

2.9. Идентификация кофактора ЛО

Спектрофотометрический метод. Фермент в количестве 2,5 мг растворяли в 1 мл воды, выдерживали на кипящей водяной бане в течение 5 мин, после чего денатурированный белок осаждали на центрифуге. Кофактор определяли по спектрам поглощения ($E_{460}=11,0 \text{ мМ} \cdot 1 \cdot \text{см}^{-1}$).

Метод ВЭЖХ. В электрофоретически гомогенный препарат ЛО (2,5 мг) в 100 мкл трис-НСI буфера добавляли 10 мкл 50 % ТХУ. Затем образец центрифугировали при 10 000 g в течении 10 мин. для полного осаждения белковых компонентов. Супернатант отделяли и анализировали на колонке Phenomenex C18 (США), 5 мкм, 250 x 4,6 мм. Хроматографию проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Prostar 210 (США). Для элюции использовали раствор 0,02 М ацетатного буфера рН 4,5 и метиловый спирт в соотношении 60:40 (об./об.). Скорость иллюции составляла 0,5 мл/мин. В качестве детектора использовали флюориметр «Varian 9070» (США), при длине волны возбуждения, равной 480 нм, длине волны испускания, равной 520 нм. Расчеты концентрации аналитов в образце проводили, используя калибровочную кривую, построенную с помощью разведения стандартного образца ФАД и ФМН (Sigma, США) в концентрациях 0,5; 0,7; 1; 2; 2,5 мкг/мл.

2.10. Определение зависимости активности ЛО от рН

Для определения зависимости активности фермента от рН использовали (0,05 М) буферные растворы с разными значениями рН: натрий-ацетатный буфер рН 3,0-6,0 фосфатный буфер, рН 6,0-8,5, глициновый буфер, рН. 8,0-9,5. Концентрации ЛО составляла 4 мкг/мл.

2.11. Определение зависимости активности ЛО от температуры

ЛО в трис-НСI буфере (рН 7,8; 25 мМ) инкубировали в течение 10 мин при температурах от 5 до 45 °С. Затем измеряли активность фермента полярографически (по потреблению кислорода) в термостатируемой ячейке. Концентрации ЛО составляла 4 мкг/мл.

2.12. Определение энергии активации ЛО

Энергию активации определяли путем обработки результатов изучения зависимости активности ЛО от температуры (от 5 до 45 °С). Для этого использовали уравнение Аррениуса:

$$\lg V = -\frac{E}{2,303RT} + A,$$

где: V - максимальная скорость реакции, R - газовая постоянная (1,987 кал/моль·град), A – постоянная интегрирования, T - температура в °К.

2.13. Определение термостабильности ЛО

Фермент (в концентрации 4 мкг/мл) инкубировали в трис-НСl буфере (рН 7,8; 25 мМ) в течение 1 ч при температурах 20, 28, 37, 50, 60, 70 или 80 °С. Затем активность фермента измеряли спектрофотометрически при температуре 22 °С.

2.14. Стабильность при хранении

Для определения стабильности фермента при хранении, стерильный препарат ЛО подвергали инкубации при 37°С в течение 5 дней. Пробы для определения активности ЛО отбирали 1 раз в сут.

2.15. Определение устойчивости к действию протеолитических ферментов

В работе использовали проназу (Sigma, США), трипсин и химотрипсин (Fluka). ЛО (10 Е) в буферном растворе рН=8,0 (25 мМ трис-НСl + 2 мМ СаСl₂) инкубировали при 37 °С в присутствии гидролаз в течение 10 сут. Концентрация трипсина, химотрипсина, проназы составляла 2 мг/мл. Параллельно инкубировали контрольный образец ЛО без протеолитических ферментов. Пробы для определения активности ЛО отбирались каждые сут.

2.16. Устойчивость ЛО к действию детергентов и хаотропных агентов

Для определения стабильности ЛО к воздействию ДСН, мочевины и гуанидинхлорида готовили раствор фермента активностью 20 Е в трис-НСl буфере рН 7,8.

Для определения устойчивости к ДСН – к полученным 0,5 мл раствора добавляли по 0,5 мл 6 % ДСН в трис-НСl буфере; к действию мочевины – раствор фермента, содержащий 10Е, в трис-НСl буфере насыщали мочевиной до концентрации 6 М; к действию гуанидинхлорида – в раствор фермента (0,5 мл) добавляли 0,5 мл 3 % раствора гуанидинхлорида.

Инкубирование проводили при температуре 37 °С в течение 3 ч. Контрольные замеры активности проводили каждые 20 мин, активность измеряли полярографически.

2.17. Характеристика ПМР-спектров

ПМР-спектры снимали в растворителе – D₂O на приборе Avans-600, Bruker BioSpin. Работа выполнена д.б.н., проф. Кутышенко В.П. (лаборатория ЯМР-исследований биосистем, ИТЭБ РАН, г. Пушкино).

2.18. Определение кинетических параметров ЛО

Определение зависимости активности ЛО от её концентрации проводили при концентрации лизина, равной 50 мкМ. Содержание белка варьировали от 0,5 до 8 мкг на мл.

Зависимости активности фермента от концентрации лизина проводили при концентрации ЛО, равной 4 мкг/мл. Концентрацию лизина варьировали от 0,5 до 100 мкМ.

Скорость окислительного дезаминирования L-лизина определяли спектрофотометрически при длине волны 450 nm (двулучевой спектрофотометр CF-4 DR Optica Milano Италия). Реакцию проводили в 0,05 М Трис-НСl буфере (pH 7,8) при температуре 37 °С и ионной силе раствора равной 0,1М NaCl. Реакционный раствор содержал *o*-дианизидин, пероксидазу хрена (смотреть п. 2.2) и субстрат в различных концентрациях. Для инициации реакции в рабочую кювету добавляли ЛО в концентрации, равной 4 мкг/мл.

Начальная скорость реакции (v_0) была рассчитана по тангенсу угла наклона начального участка кинетической кривой, полученной в результате проведения пяти параллельных экспериментов.

Для увеличения точности измерения начальной скорости реакции и уменьшения начального периода обнаружения реакции было использовано специальное устройство для быстрого перемешивания (Krupyanko, 1990).

Относительная активность ЛО (A , %) была определена по следующей формуле:

$$A = v_{an} \cdot 100/v_0$$

Среднее квадратичное отклонение в пяти повторностях для v_0 было равно $\pm 2,5\%$, для $S_{0,5}^h$, V и h равны $\pm 10\%$. (Sigma Plot 10, США) (Krupyanko, 2007).

2.19. Исследование субстратной специфичности фермента

Для определения субстратной специфичности использовали L-изомеры лизина, лейцина, фенилаланина, цитруллина, аланина, аспарагина, гистидина, орнитина, глутамина, треонина, тирозина, изолейцина, валина, а также глицин, D-лизин и 2,6-диаминопимелиновую кислоту. Концентрация субстратов составляла 0,5 мМ, ЛО – 4,0 мкг/мл.

2.20. Определение антимикробного действия ЛО

Антимикробное действие ЛО проводили согласно требованиям Государственной Фармакопеи. Использовали следующие тест-микробные организмы: *Bacillus subtilis* ВКМ В-720, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ГИСК 453, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus durans* ВКМ В-603, *Clostridium sporogenes* ГИСК 272, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-1249. Кроме того, были протестированы 2 фитопатогенных гриба: *Fusarium decemcellulare* ВКМ F-1179 и *Rhizoctonia solani* ВКМ F-895. Указанные тест-микробные организмы были получены из ВКМ (ИБФМ РАН), а также РУДН и ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина для исследований в рамках совместного проекта.

Тест-штаммы бактерий хранили при температуре $(5 \pm 1)^\circ \text{C}$ под слоем стерильного вазелинового масла на среде Романова следующего состава: панкреатический гидролизат казеина 8,0 г; натрия хлорид 5,0 г, агар 10,0 г, вода, дистиллированная 100,0 г, рН после стерилизации $7,1 + 0,1$.

Тест-культуру *A. niger* хранили на агаре Сабуро (Госфармакопея, вып.2, с.200), пересевая через каждые 3 месяца. Посевы *A. niger* на среде Сабуро инкубировали при температуре $22,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ до появления черных или темнокоричневых экзогенных спор (конидий) в течении 5-7 сут. Культуру гриба *A. niger* выращивали заранее, за 5-7 сут до начала определения. При определении антимикробного действия ЛО готовили взвеси культур тест-микробных организмов в конечной концентрации не более 100 КОЕ в 1 мл.

Приготовление проб для определения антимикробного действия ЛО. С помощью стерильного шприца во флакон вносили 5 мл стерильного изотонического раствора и осторожно встряхивали. При этом концентрация фермента составляла ~ 150 Е/мл. Пробы отбирали стерильным шприцом.

В пробирки с 10 мл соответствующей питательной среды, рекомендованной для испытания, вносили по 1 мл приготовленной взвеси тест-микробного организма, после чего добавляли по 0,2 мл (~ 30 Е) исследуемого образца фермента. В контрольных вариантах вместо фермента в пробирки вносили по 0,2 мл соответствующей питательной среды (положительный контроль). Испытание проводили дважды с каждым микроорганизмом в отдельности. Посевы на тиогликолевой среде инкубировали при температуре $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ в течение 3-х сут.

Посевы на жидкой соево-казеиновой среде и среде Сабуро инкубировали при температуре $22,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ в течение 5 сут.

Сравнение роста тест-микробных организмов в контрольных и опытных посевах осуществляли при визуальном просмотре. Считали, что образец проявлял бактериостатическое

или фунгистатическое действие, если в контроле наблюдали рост тест-микроорганизма, а в опыте рост отсутствовал.

Для определения антимикробного действия на твердой среде на стерилизованные диски из фильтровальной бумаги наносили стерильную ЛО (0,1-5,0 Е), L-лизин (10 мкМ), каталазу (10 мкг). Затем диски просушивали в стерильном боксе.

На чашки Петри с агаризованной средой 5/5 засеивали (посев «газоном») тестовые культуры микроорганизмов: *E. durans* ВКМ В-603, *P. aureofaciens* ВКМ В-1249, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ВКМ В 720, *S. aureus* ATCC 6538. После засева на поверхность агаризованной среды раскладывали подсушенные диски с нанесенными компонентами (ЛО, L-лизин, каталаза) и инкубировали при температуре 32 °С в течение 1 сут. Образовавшиеся зоны лизиса вокруг дисков оценивали визуально. Испытания проводили в трех повторностях.

2.21. Испытание препарата ЛО на стерильность

Пробы ЛО готовили, как указано в п. 2.22.

Определение стерильности определяли двумя методами:

- а) методом прямого посева;
- б) методом мембранной фильтрации.

Метод прямого посева. Для посева на питательные среды (содержащие указанные выше инактиваторы антимикробной активности), использовали по 0,5 мл содержимого флакона с разведенным в изотоническом растворе ферментом ЛО. Объем среды – 50 мл.

Метод мембранной фильтрации.

1 вариант. Для мембранной фильтрации использовали фильтрационную установку, включающую воронку Бюхнера и колбу Бунзена. Стерильным шприцем отбирали из флаконов по 2,5 мл исследуемого образца и асептически переносили на фильтр. Исследуемый раствор вводили и фильтровали в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану промывали стерильным 0,9 %-ным раствором хлорида натрия (150 мл). Испытания проводили под вакуумом водоструйного насоса. Использовали мембранные фильтры размером пор $0,45 \pm 0,02$ мкм и внешним диаметром 47 мм. Фильтры после промывания асептически (стерильным пинцетом) переносили в колбу, содержащую 50 мл питательной среды.

2 вариант. Для мембранной фильтрации использовали также мембранные фильтры Schleicher & Schuell FP 030/3 с размером пор 0,2 мкм общим диаметром 26 мм (рабочий диаметр 3 мм). Стерильным шприцем отбирали из флаконов по 2,5 мл исследуемого образца и асептически переносили на фильтр. После продавливания раствора (7 bar) фильтр трижды промывали стерильным 0,9 % раствором хлорида натрия (по 10 мл), рН 7,0. После этого в

отверстие для фильтра стерильной пипеткой добавляли среду роста (2-3 капли) и пипетировали. Той же пипеткой всю жидкость из отверстия переносили в колбу с той же средой роста, что и в первом варианте.

Все посеы вариантов 1 и 2 инкубировали в течение 14 сут. Наличие роста микроорганизмов определяли визуально. Использовали жидкую тиогликолевую среду ($32,5 \pm 2,5$ °C), а также жидкую среду Сабуру ($22,5 \pm 2,5$ °C).

Все опыты, включая испытание на стерильность, проводили в асептических условиях, используя бокс.

Питательные среды. Для испытания использовали жидкую тиогликолевую среду, жидкую среду 5/5, жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуру. Среды стерилизовали в автоклаве при 112 – 121 °C 30 мин. Все среды проверяли на стерильность, после чего определяли ростовые свойства.

Жидкая тиогликолевая среда (г/л): L-цистина – 0,5, натрия хлорида – 2,5, глюкозы моногидрата – 5,5, агара гранулированного (Panreac, США) – 0,75, дрожжевого экстракта (водорастворимого) (Pronadisa, Испания) – 5,0, панкреатического гидролизата казеина (Самсон-Мед, Россия) – 15,0, натрия тиогликолята – 0,5 или кислоты тиогликолевой – 0,3, (AppliChem, США) раствора резазурина натрия (1:1000) – 1,0 мл свежеприготовленного, pH после стерилизации – $7,1 \pm 0,2$.

В воду вносили L-цистин, агар, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина и нагревали до полного растворения. Добавляли натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, доводили pH среды 1 М раствором натра едкого. Затем вливали раствор резазурина, перемешивали и разливали в пробирки соответствующего объема.

Жидкая среда 5/5 (г/л): бакто-триптон – 5,0, соевый пептон – 5,0, дрожжевой экстракт – 1,0, (Pronadisa, Испания) аминокислот – 60 мл (Самсон-Мед, Россия).

Плотная среда 5/5: среду готовили как описано выше и добавляли микробиологический агар (2 %). Перед стерилизацией среду кипятили до полного растворения агара.

Жидкая соево-казеиновая среда (г/л): панкреатического гидролизата казеина – 17,0, папаинового гидролизата соевой муки – 3,0, натрия хлорида – 5,0, калия фосфата двузамещенного – 2,5, глюкозы – 2,5, pH после стерилизации – $7,3 \pm 0,2$.

Компоненты растворяли в воде, если необходимо при нагревании. Охлаждали до комнатной температуры. После стерилизации pH среды доводили 1 М раствором натра едкого до $7,3 \pm 0,2$. Фильтровали для получения прозрачной среды, разливали по пробиркам и стерилизовали в автоклаве при 112 °C 30 мин.

Жидкая среда Сабуро (г/л): пептона ферментативного –10,0, глюкозы моногидрата – 40,0, pH после стерилизации – $5,6 \pm 0,2$.

Пептон и глюкозу добавляли в воду и полностью растворяли при слабом нагревании. Охлаждали до комнатной температуры и доводили pH до требуемого значения. Фильтровали, если необходимо, и разливали в пробирки. Среду стерилизовали в автоклаве при 112 °C 30 мин.

Жидкая среда Ридер (г/л): 10,0 – глюкозы, 3,0 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,7 – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,5 – NaCl, 2,0 – KH_2PO_4 , 0,2 - %-ного дрожжевого экстракта, микроэлементы по Буркгольдеру, мг/л: KI – 0,2, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ – 0,1, MnSO_4 – 0,1, ZnSO_4 – 0,1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5, Na_2MoO_4 – 0,1. Фильтровали для получения прозрачной среды, разливали по пробиркам и стерилизовали в автоклаве при 112 °C 30 мин.

2.22. Устранение антимикробного действия

Для устранения антимикробного действия исследуемого образца ЛО (согласно нормативным документам) использовали неспецифические инактиваторы: твин-80, яичный лецитин, которые добавляли в питательные среды до стерилизации в концентрациях соответственно 10 и 3 г/л.

2.23. Анализ содержания аминокислот в среде роста *Trichoderma*

Для анализа содержания аминокислот в среде культивирования *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D аликвоты культуральной жидкости обрабатывали хлорной кислотой (конечная концентрация 5 %), центрифугировали при 10 000 g. Концентрацию свободных аминокислот в супернатанте определяли с помощью анализатора аминокислот LC 2000 “Biotronic” (Германия). Анализ аминокислот был проведен Лысанской В.Я. (ИБФМ РАН).

2.24. Определение пероксида водорода

Определение пероксида водорода в культуральной жидкости проводили по изменению поглощения о-дианизидина в присутствии пероксидазы хрена на спектрофотометре «Shimadzu - UV160» при 436 нм. К аликвоте культуральной жидкости (0,1-0,2 мл) добавляли реакционную смесь до 1 мл, содержащую о-дианизидин (0,2 мМ) в 25 мМ *трис*-фосфатном буфере (pH 7,5). Реакцию начинали добавлением пероксидазы до концентрации 0,5 мкг/мл. После развития окраски пробу центрифугировали 5 мин при 12000 g. Количество H_2O_2 рассчитывали по изменению поглощения о-дианизидина ($E_{436}=8,3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

2.25. Определение активности протеолитических ферментов в культуральной жидкости

Протеолитическую активность измеряли с использованием стандартного азоказеина (Alarcon *et al.*, 2002). Культуральную жидкость центрифугировали при 6000 g. В пробирку вносили 0,5 мл супернатанта и 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,0 содержащего 5 мМ ЭДТА (0,1 мл). Реакцию начинали добавлением 2 %-го азоказеина (250 мкл) и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. Останавливали реакцию добавлением к содержимому пробирки 1 мл 6%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем смесь центрифугировали и измеряли адсорбцию супернатанта при длине волны 366 нм на спектрофотометре «Shimadzu - UV160» (Япония).

2.26. Определение пипеколиновой кислоты в культуральной жидкости

Пипеколиновую кислоту в культуральной жидкости определяли после экстракции этилацетатом (1:10, об./об.). Экстракт высушивали, осадок растворяли в метаноле и анализировали с помощью масс-спектрометрии (Finnigan LCQ Advantage MAX, Germany).

Масс-спектрометрический анализ был проведен Баскуновым Б.П. (ИБФМ РАН).

2.27. Измерение образования АФК в клетках

В жидкую питательную среду 5/5 засеивали *S. aureus* ATCC 6538 или фитопатогенные грибы *R. solani* ВКМ F-895 и суспендировали при температуре 30 °С, рост микроорганизмов контролировали по оптической плотности. В суспензию растущих клеток, оптическая плотность которой достигала 0,5, добавляли ЛО в концентрациях 5 или 10 мкг/мл. Пробы отбирали каждые 3 ч в случае *S. aureus* ATCC 6538 и каждые 12 ч для *R. solani* ВКМ F-895.

Измерение уровня АФК в клетках проводили с помощью флуоресцентного красителя дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (Sigma, США) при λ возбуждения 485 нм и λ эмиссии 528 нм на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония) (Yang *et al.*, 2011).

Количество жизнеспособных клеток бактерий и фитопатогенных грибов в пробах после инкубации с ЛО определяли с помощью наборов диагностических красителей на живые и мертвые клетки: LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits и LIVE/DEAD Kit for Yeast and Fungi (Thermo Fisher Scientific США). Красители смешивали в равных долях по 10 мкл и добавляли по 3 мкл этой смеси к 0,5 мл суспензии клеток. Инкубировали образцы 30 мин при комнатной температуре в полной темноте. Результаты оценивали при помощи флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Lab.A1. Подсчет живых и мертвых клеток проводили в поле зрения микроскопа в 5-ти повторностях для каждого образца.

2.28. Лиофилизация ЛО

Для лиофилизации фермента использовали аппарат для лиофильной сушки ЛС 500 производства фирмы «Проинтех» (Россия).

Конденсор охлаждали до температуры $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем на охлаждающую полку выставляли препарат, предварительно замороженный до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Создавали вакуум в камере на -5 атм . Процесс лиофилизации проводили в течении 2 сут.

2.29. Статистическая обработка данных

Данные экспериментов подвергали статистической обработке с использованием программы «Microsoft Excel 2013». В качестве критерия достоверности обнаруженных межгрупповых различий был выбран t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

При применении данного метода варьирование показателей в каждом ряду не оказывает значительного влияния на конечные результаты и тем самым достигается независимость показателей от индивидуальных различий.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Отбор штамма-продуцента ЛО (твердофазная ферментация)

Были проверены 14 музейных штаммов рода *Trichoderma*, полученных из ВКМ (ИБФМ РАН) (см. Материалы и методы). Кроме того, были протестированы 8 штаммов грибов, выделенных из образцов почв лесного массива г. Пушкино. Предварительные исследования (окраска, форма колоний, а также другие морфологические характеристики) дали основания отнести эти культуры к роду *Trichoderma*.

Все исследуемые штаммы активно росли на среде Чапека, мальт агаре, сусло-агаре и других средах, включая увлажненные пшеничные отруби (визуальное определение). Однако способность к синтезу внеклеточной ЛО наблюдалась только у 4-х штаммов: 3-х музейных, а также почвенного изолята *Trichoderma* sp. 6. Следует отметить, что заметный синтез ЛО имел место только при культивировании этих грибов на средах, содержащих пшеничные отруби и соли неорганического азота (таблица 4). Наибольший синтез фермента отмечался у *Trichoderma* sp. 6, в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 %) активность достигала 60 Е/г субстрата. В присутствии других солей азота уровень активности ЛО был в несколько раз ниже.

Таблица 4. Синтез внеклеточной ЛО при твердофазном культивировании грибов *Trichoderma* на пшеничных отрубях

Штамм	Активность ЛО*, Е/г субстрата					
	контроль	NaNO_3	KNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	NH_4NO_3
<i>T. aureoviride</i> ВКМ F- 2026	2	15	10	10	10	20
<i>T. viride</i> ВКМ F-2721	2	20	10	15	10	20
<i>T. virens</i> ВКМ F-1117	1	10	10	5	5	15
<i>Trichoderma</i> sp. 6.	5	25	20	60	15	30

*Указана максимальная активность, наблюдаемая на 12-14 сут ферментации.

Ранее японскими исследователями также было показано (Kusakabe *et al.*, 1979), что биосинтез ЛО штаммом *T. viride* осуществлялся только на средах, содержащих пшеничные отруби и только в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Также способность к синтезу ЛО в присутствии

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ была показана ранее для *T. aureoviride* Rifai ВКМ F-2026, *T. longibrachiatum* ВКМ F-2025, *T. harzianum* Rifai, *Trichoderma* sp. ВКМ F-2030 (Смирнова, Березов, 1987). Однако уровень биосинтеза ЛО для указанных штаммов был ниже по сравнению с активностью найденного нами природного штамма.

Таким образом, в результате поиска продуцентов внеклеточной ЛО среди грибов рода *Trichoderma* нами найдены 4 штамма, среди которых наиболее активным оказался природный штамм *Trichoderma* sp. 6.

Было изучено влияния температуры культивирования гриба *Trichoderma* sp. 6 на уровень накопления фермента. Как можно видеть из результатов, представленных в таблице 5, температура культивирования оказывала заметное влияние на уровень биосинтеза ЛО. При 28 °С накопление фермента достигало 60 Е/г субстрата. Увеличение температуры до 37 °С приводило к резкому снижению биосинтетической активности культуры, при этом отмечали также резкое снижение роста самого гриба (визуальное наблюдение), отсутствие воздушного мицелия, увеличивалась пигментация (образование темного пигмента). При 24 °С биосинтез ЛО был менее эффективный, чем при 28 °С. Эти данные можно рассматривать, как предварительные. Оптимальный температурный режим будет подобран в последующих экспериментах, а именно: при проведении процессов в условиях погруженного культивирования, в том числе, в биореакторах.

Таблица 5. Биосинтез ЛО грибом *Trichoderma* sp. 6 в условиях твердофазной ферментации при различной температуре

Температура	Активность*, Е/г субстрата	Длительность ферментации, Сут
28 °С	60	12
24 °С	54	14
37 °С	9	7

3.2. Определение таксономического положения штамма *Trichoderma* sp. 6

На рис. 3 представлены микрофотографии гриба *Trichoderma* sp. 6. При росте на агаризованном сусле или пшеничных отрубях для данной культуры характерно образование ветвистых вегетативных гиф. Конидиеносцы - ветвистые, собраны в компактные мутовки с боковыми веточками - в группах по 2-3 (отходят под тупым углом), стерильные отростки конидиеносцев отсутствуют. Фиалиды бутылевидные. Конидии большей частью округлые, гладкие. Хламидоспоры - верхушечные, на коротких боковых веточках, шаровидные,

бесцветные. Мицелий септирован. В цитоплазме содержатся органеллы типичные для эукариотической клетки, в т.ч. микротельца.

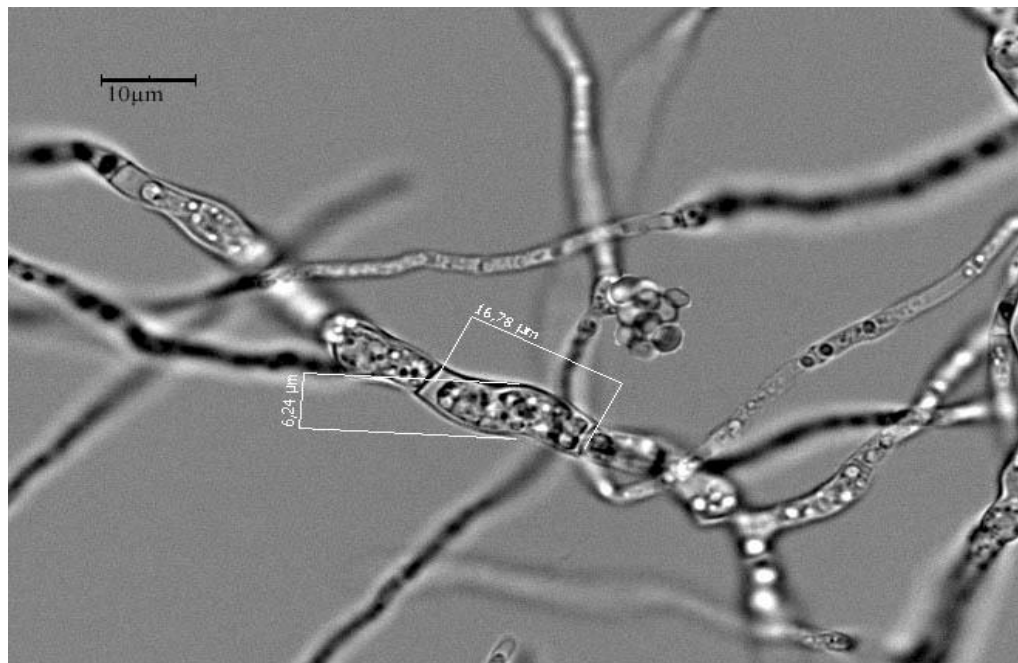


Рис. 3. Морфологическая характеристика гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, продуцирующего ЛО. Фотографии получены с помощью световой микроскопии. Микроскоп ZEISS AXIOVISION 200 M

Возрастная дифференциация вегетативных гиф заключалась в уменьшении плотности цитоплазмы за счет уменьшения рибосомального компонента, увеличении количества и размеров липидных включений и увеличении объема клетки, занимаемого вакуолярным компартментом. После образования первичного мицелия с возрастом усиливается образование боковых вегетативных гиф. При росте как на агаризованном сусле, так и на отрубях, грибы образуют серо-белый ворсистый газон, спорообразование сопровождается образованием бурозеленого пигмента. Размер конидиального кластера – 9 мкм, размер конидии – 4–6 мкм, диаметр конидиофоры - 3 мкм, диаметр гиф - 4-5 мкм. Аналогичные данные по макро- и микроморфологии получены при выращивании штамма на агаризованном сусле, картофельно-глюкозном агаре и среде Чапека, на которых проявлялся активный рост гриба.

Полученные результаты позволили определить таксономическую принадлежность исследуемого штамма как *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai.

Данный штамм был депонирован в ВКМ (ИБФМ РАН) как *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D.

3.3. Оптимизация синтеза ЛО грибами *Trichoderma* в условиях глубинного культивирования

3.3.1. Подбор состава среды культивирования (опыты в колбах)

Известно, что одним из эффективных методов повышения биосинтетической активности грибов является оптимизация состава среды роста. В связи с этим были проведены эксперименты по оптимизации условий культивирования в погруженной культуре.

Для этого были выбраны грибы *T. longibrachiatum* Rifai ВКМ F-2025, *T. aureoviride* ВКМ F-2026, *T. viride* ВКМ F-2721, а также *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, для которых была показана способность синтезировать ЛО при культивировании на твердом субстрате (увлажненных отрубях) (таблица 4). На первом этапе опыты проводили в колбах, а затем осуществляли оптимизацию процесса в ферментерах.

3.3.1.1. Субстрат роста

Было проведено погруженное культивирование 4-х отобранных штаммов-продуцентов (таблица 4) на среде Чапека с различными источниками углерода: глюкозой или крахмалом, или сахарозой, или кукурузным экстрактом. Использовались также среды, содержащие сусло, или мальтозу.

Известно, что грибы рода *Trichoderma* обитают на растительном перегное, часть которого формируют дикие и культурные злаковые растения (Алимова и др., 2007), поэтому культивирование отобранных ранее штаммов проводили также на средах, содержащих размол семян или отруби различных злаковых растений (таблица 6).

Все указанные штаммы (таблица 4) достаточно интенсивно росли в условиях глубинного культивирования (визуальное наблюдение) на всех указанных средах. Однако биосинтез ЛО наблюдался только на средах, содержащих семена злаковых или отруби (таблица 6).

Можно также видеть, что только 2 из отобранных ранее штаммов (указанных в таблице 4) были способны синтезировать ЛО, а именно: *T. aureoviride* ВКМ F-2026 и *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D. Уровень накопления активности ЛО после культивирования гриба в течение 11-13 сут варьировал в пределах 2,5 - 7 Е/г субстрата в случае дикорастущих злаков и 10-15 Е/г в случае культурных зерновых. Наибольший биосинтез наблюдался при росте гриба на ржаных или пшеничных отрубях: 87 и 104 Е/г.

Следует отметить, что для указанных штаммов *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D и *T. aureoviride* ВКМ F-2026 глубинное культивирование является более эффективным, чем поверхностная (твердофазная) ферментация. Для двух других исследуемых штаммов изменение условий культивирования приводило к потере способности синтезировать ЛО.

Таблица 6. Синтез ЛО грибами *Trichoderma* при росте на измельченных семенах или отрубях различных злаковых культур

Субстрат	Активность, Е/г	
	<i>T. aureoviride</i> ВКМ F-2026	<i>T. cf. aureoviride</i> Rifai ВКМ F-4268D
1. Кукурузасахарная (<i>Zea mays</i>)	8	10
2. Пшеница (<i>Triticum durum</i>)	12	15
3. Отруби пшеничные	87	104
4. Рожь посевная (<i>Secale cereale</i>)	7,5	10
5. Отруби ржаные	67	85
6. Просо обыкновенное (<i>Panicum miliaceum</i>).	2,7	4,5
7. Ежа сборная (<i>Dactylis glomerata</i>)	4	6
8. Мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i>)	4	6,5
9. Вейник наземный (<i>Calamagrostis epigæjos</i>)	2,5	5
10. Костер безостый (<i>Bromus inermis</i>)	5	7
11. Пырей ползучий (<i>Elytrigia repens</i>)	5	7
12. Овес обыкновенный (<i>Avena sativa</i>)	3	5
13. Ячмень обыкновенный (<i>Hordeum vulgare</i>)	4,5	6

Во всех случаях в культуральной среде содержалось 4% NH_4Cl . Культивирование проводили при 28 °С.

3.3.1.2. Влияние различных солей на биосинтез ЛО

Из результатов, представленных в таблице 7, видно, что биосинтез фермента зависел от концентрации различных солей. Лучшие результаты были получены в присутствии 4 % NH_4Cl при использовании гриба *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D – в среде накапливалось 8,4 Е/мл ЛО (120 Е/г субстрата).

Надо отметить, что указанное накопление ЛО в реакционной среде в 2 раза превышало уровень биосинтеза ЛО при культивировании на твердом субстрате (сравн. таблица 4).

Зависимость интенсивности биосинтеза ЛО от условий культивирования, в частности, типа ферментации и присутствия солей азота, была показана ранее японскими исследователями для гриба *T. viride* (Kusakabe et al., 1979). В условиях твердофазной ферментации добавление NaNO_3 приводило к увеличению активности в 3 раза, но в погруженной культуре биосинтез

практически отсутствовал. Наоборот, биосинтез ЛО *T. harzianum* Rifai протекал более эффективно в погруженной культуре (Лукашева и др., 2002, Смирнова и др., 1987).

Таблица 3. Влияние источника неорганического азота на синтез ЛО *T. aureoviride* ВКМ F-2026 *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D в условиях погруженного культивирования

	Концентрация солей, %	Активность, Е/г отрубей	
		<i>T. cf. aureoviride</i> Rifai ВКМ F-4268D	<i>T. aureoviride</i> ВКМ F-2026
контроль	0	5	5
NaNO ₃	2	30	25
	4	50	40
	6	75	50
	8	20	15
NH ₄ NO ₃	2	30	25
	4	80	70
	6	90	80
	8	50	40
NH ₄ Cl	2	80	55
	4	120	85
	6	75	70
	8	45	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	40	30
	4	95	50
	6	75	50
	8	30	20
NaCl	2	25	25
	4	70	65
	6	115	82
	8	20	20

На рис. 4 в качестве примера приведена динамика накопления ЛО в ферментационной среде в условиях погруженного (1) и твердофазного (2) культивирования.

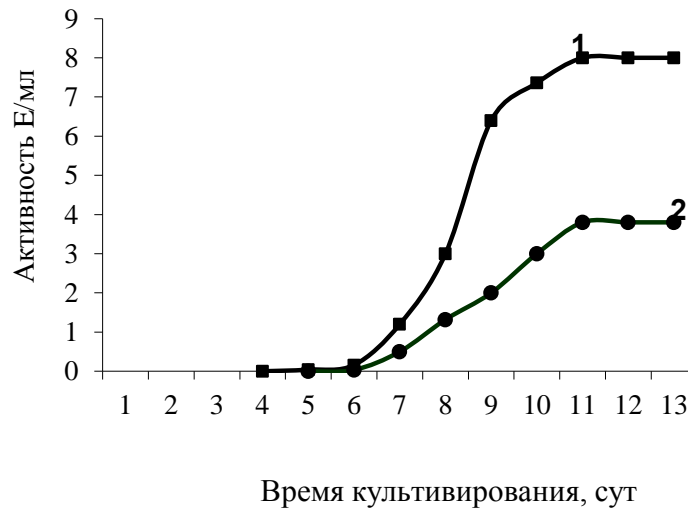


Рис. 4. Синтез ЛЮ грибом *T. cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D в условиях погруженного (1) и твердофазного культивирования (увлажненные отруби) (2) (при температуре 28 °С).

Проведенные нами исследования показали также, что вместо солей азота для стимулирования синтеза ЛЮ можно использовать NaCl. На рис. 5 представлены результаты сравнительного изучения биосинтеза фермента на пшеничных отрубях в присутствии (1) и в отсутствии (2) NaCl в условиях погруженного культивирования. Так, в присутствии 6 % NaCl



Рис. 5. Синтез ЛЮ при росте гриба *T. cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D на пшеничных отрубях в присутствии 6 % NaCl (1) и в отсутствии солей (2) в условиях погруженного культивирования.

(ионная сила при этом составляла ~ 1 М) появление активности ЛЮ отмечалось уже на 2 сут культивирования и достигало максимального уровня (8 Е/мл) на 11–12 сут (кривая 1). Без добавления хлорида натрия активность внеклеточной ЛЮ практически отсутствовала (кривая 2).

Следует отметить, что концентрации солей азота, определенные ранее как оптимальные для биосинтеза ЛО (таблица 6) также соответствуют ионной силе, равной ~ 1 М. Можно полагать, что указанные условия (присутствие солей) являются условиями солевого стресса, которые и провоцируют синтез ЛО у гриба.

Показано также, что другие соли, а именно: KCl, MgCl₂, а также Na₂SO₄ в сопоставимых концентрациях также стимулировали биосинтез фермента, что говорит в пользу того, что для биосинтеза ЛО необходимы не только «благоприятные», но и стрессовые условия.

Таким образом, варьирование условий культивирования позволило выявить перспективный штамм *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D, демонстрирующий высокий биосинтез ЛО в погруженной культуре. При этом найдено, что оптимальным субстратом роста и биосинтеза фермента являются пшеничные отруби. Показано также, что биосинтез фермента значительно зависел от концентрации солей в среде роста.

3.3.1.3. Подбор оптимального количества субстрата роста

Подбор оптимального количества субстрата роста для данного штамма был проведен в присутствии 4 % NH₄Cl. Наибольшее накопление ЛО в реакционной среде наблюдалось при содержании отрубей равном 7 г на 100 мл среды (таблица 8). Оптимальное содержание отрубей, вероятно, обусловлено массообменом реакционной среды, в частности, снабжением культуры кислородом.

Таблица 8. Влияние количества субстрата роста на биосинтез ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D

Количество субстрата, г /100 мл среды	Активность*, Е/г субстрата	Активность*, Е/мл
3	100	3,0
4	102	4,1
5	104	5,2
6	113	6,8
7	128	9,0
8	105	8,4
9	90	8,1

*Указана максимальная активность (среда роста содержала 100 мл дистиллированной воды, пшеничные отруби и 4 г NH₄Cl температура роста 28 °С).

3.3.1.4. Влияние сахаров на биосинтез ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D

В качестве дополнительных источников углерода на фоне пшеничных отрубей были использованы глюкоза, мальтоза, сахароза и крахмал в концентрациях 4 %. Однако ни одно из добавленных соединений не оказало положительного эффекта на биосинтез ЛО (как в присутствии, так и в отсутствии NH_4Cl). Следует отметить, что при использовании ростовых сред, содержащих эти сахара в качестве единственного источника углерода (без отрубей), наблюдался интенсивный рост гриба, но при этом полностью отсутствовала ЛО активность.

3.3.1.5. Влияние аденина, аденозина, гуаназина, инозина, АМФ, АДФ, АТФ, L-глутамина, L-гистидина, глицина на биосинтез ЛО

Японскими исследователями (Kusakabe *et al.*, 1979) было показано стимулирующее действие некоторых адениновых и пуриновых нуклеозидов, L-гистидина, глицина, L-глутамина (в концентрациях 4 % от веса отрубей) на синтез ЛО грибом *T. viride* при твердофазном культивировании. В оптимальном варианте (с аденином), наблюдалось увеличение активности, содержание фермента достигало 85 Е/г субстрата. В жидкой культуре эффект этих соединений был намного ниже, чем в случае твердофазной ферментации.

В настоящей работе мы также попытались повысить биосинтез фермента путем добавления в ростовую среду аденина, аденозина, гуаназина, инозина, АМФ, АДФ, АТФ, L-глутамина, L-гистидина, глицина в концентрациях 4% от веса отрубей. Небольшое повышение активности ЛО было отмечено только при добавлении глицина (на 10-15%) в отсутствие NH_4Cl , при этом активность фермента не превышала 8,3 Е/г. Во всех остальных случаях не было отмечено положительного эффекта использованных соединений ни при твердофазной ферментации, ни при глубинном культивировании.

Следует отметить, что и без указанных добавок (но в присутствии NH_4Cl) синтез фермента грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D был достаточно высокий, в среде накапливалось 8,8 - 9,2 Е/мл (125,7- 128,5 Е/г субстрата).

3.3.2. Влияние температуры на биосинтез ЛО в условиях глубинного культивирования (опыты в колбах)

Было продолжено изучение зависимости биосинтеза ЛО от температуры. На рис. 6 видно, что при температуре 37 °С биосинтез начинался раньше, чем при других температурах. При этом максимальное количество ЛО накапливалось уже на 6-8 сут культивирования, но его конечный уровень был заметно ниже, чем в остальных вариантах.

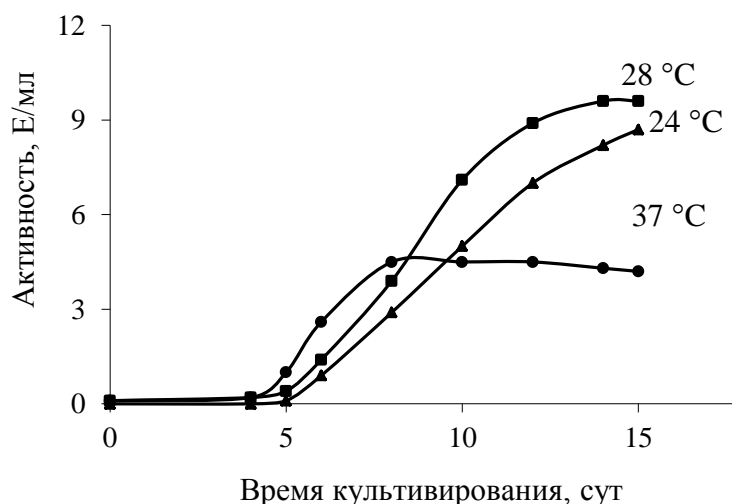


Рис. 6. Влияние температуры на биосинтез ЛО. Глубинное культивирование в колбах.

При изучении влияния температуры на синтез ЛО *Trichoderma* sp. 6 (рис. 6) было установлено, что на начальных этапах роста (до 6-8 сут), наибольший биосинтез происходил при 37 °С, однако после 10 сут ферментации происходило резкое снижение биосинтетической активности культуры. При этом также отмечалось резкое снижение роста гриба (визуальное наблюдение), отсутствие воздушного мицелия, усиленная пигментация (образование темного пигмента). При 28 °С накопление целевого продукта в реакционной среде было несколько выше: на 12 сут ферментации накапливалось 9,4 Е/мл.

При 24 °С накопление ЛО происходило более медленно, чем при 28 °С и длительность процесса увеличивалось до 17 сут. Эти данные согласуются с результатами, полученными при росте гриба на твердом субстрате (таблица 5), где оптимальная температура также соответствовала 28 °С.

3.3.3. Влияние аэрации на биосинтез ЛО (оптимизация процесса в ферментерах)

Изучение влияния аэрации на биосинтез ЛО проводили в ферментерах АНКУМ объемом 3 л (рабочий объем – 1,5 л). Культивирование осуществляли на среде, содержащей 4 % NH_4Cl при температуре 28 °С без регулирования рН (без подтитровки). Результаты влияния аэрации на биосинтез фермента представлены на рис. 7.

Так наиболее активный синтез ЛО (9 Е/мл или 128 Е/г субстрата) происходил при $p\text{O}_2$, равном 70-80 % от насыщения (7-А). При меньшем $p\text{O}_2$ (7-Б; 7-В) биосинтез ЛО был гораздо ниже, что, по-видимому, связано с недостатком кислорода для нормального роста биомассы. Во всех случаях наибольшее потребление кислорода (наибольшая подача воздуха и обороты мешалки) было зафиксировано на 4-6 сут ферментации, что, вероятно, обусловлено

наибольшими скоростью роста и дыхательной активностью культуры (при pO_2 , равном 80 %, число оборотов достигало 1100/мин, подача воздуха – 1,4 л/мин).

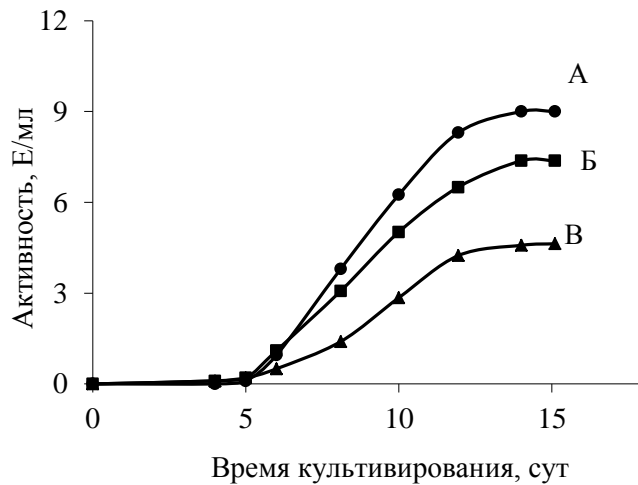


Рис.7. Влияние аэрации на синтез ЛО *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D. Режим проведения ферментации: температура – 28 °С, рН – без подтитровки.

А - pO_2 80 %; Б - pO_2 55 %; В - pO_2 30 %.

В соответствии с полученными результатами, дальнейшие эксперименты по оптимизации условий культивирования и биосинтеза фермента ЛО исследуемым штаммом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D проводили при pO_2 70-80 % от насыщения.

3.3.4. Влияние рН на биосинтез ЛО (оптимизация процесса в ферментерах)

Изучение влияния рН на биосинтез ЛО проводили при pO_2 70-80 % и температуре 28 °С (рис. 8).

При «естественном» рН, без подтитровки, в течение первых 4-х сут имело место сначала закисление среды от рН 5,8 до 4,5, затем – постепенное защелачивание до рН 7,8 (рис.8-А). Начало процесса защелачивания совпадало с появлением активности ЛО в среде. Удерживание рН на уровне 5,8 не приводило к накоплению фермента выше 85 Е/г субстрата (6 Е/мл) (рис.8-Б). При поддержании значений рН в ферментере не ниже 5,8 (рис.8-В) позволило получить максимальное накопление фермента до уровня 114 Е/г (8 Е/мл). Лучшие результаты получены в случае регулирования рН, при поддержании его на уровне не выше 6,0; при этом в среде накапливалось до 142 Е/г субстрата (10 Е/мл) (рис.8-Г).

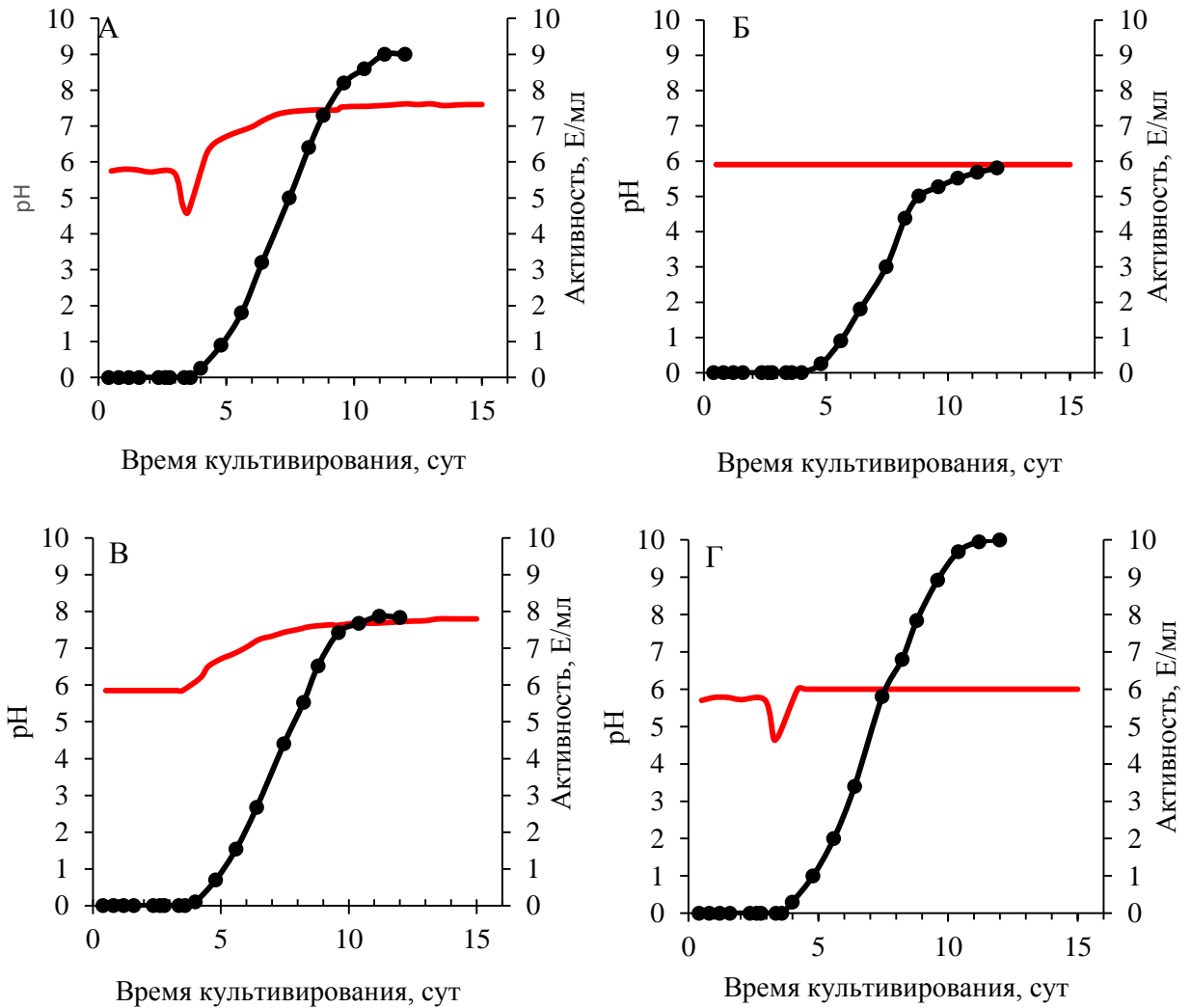


Рис. 8. Синтез ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D в ферментерах при различных значениях pH. pO_2 - 70-80 %, температура – 28 °С. А - pH - без подтитровки; Б - pH = 5,8; В - pH \geq 6,0; Г - pH \leq 6,0. —●— -активность фермента, — - pH.

3.3.5. Влияние температуры на биосинтез ЛО (оптимизация процесса в ферментерах)

На рис. 9 представлены результаты изучения влияния температуры на биосинтез ЛО в ферментерах при контролируемых параметрах pO_2 и pH: аэрацию во всех исследуемых случаях поддерживали на уровне pO_2 , равном 70-80 % от насыщения, pH не регулировали.

На начальных этапах роста наибольший биосинтез наблюдался при 37 °С (рис. 9-А), но после 6-8 сут ферментации процесс заканчивался, дальнейшего накопления ЛО в реакционной среде не наблюдалось. При 24 °С (рис. 9-В) длительность процесса увеличивалось до 15 сут. Наибольшее накопление целевого продукта в культуральной среде происходило при 28 °С, к 11-12 сут в реакционной среде накапливалось до 10 Е/мл (142 Е/г субстрата) (рис. 9 - Б).

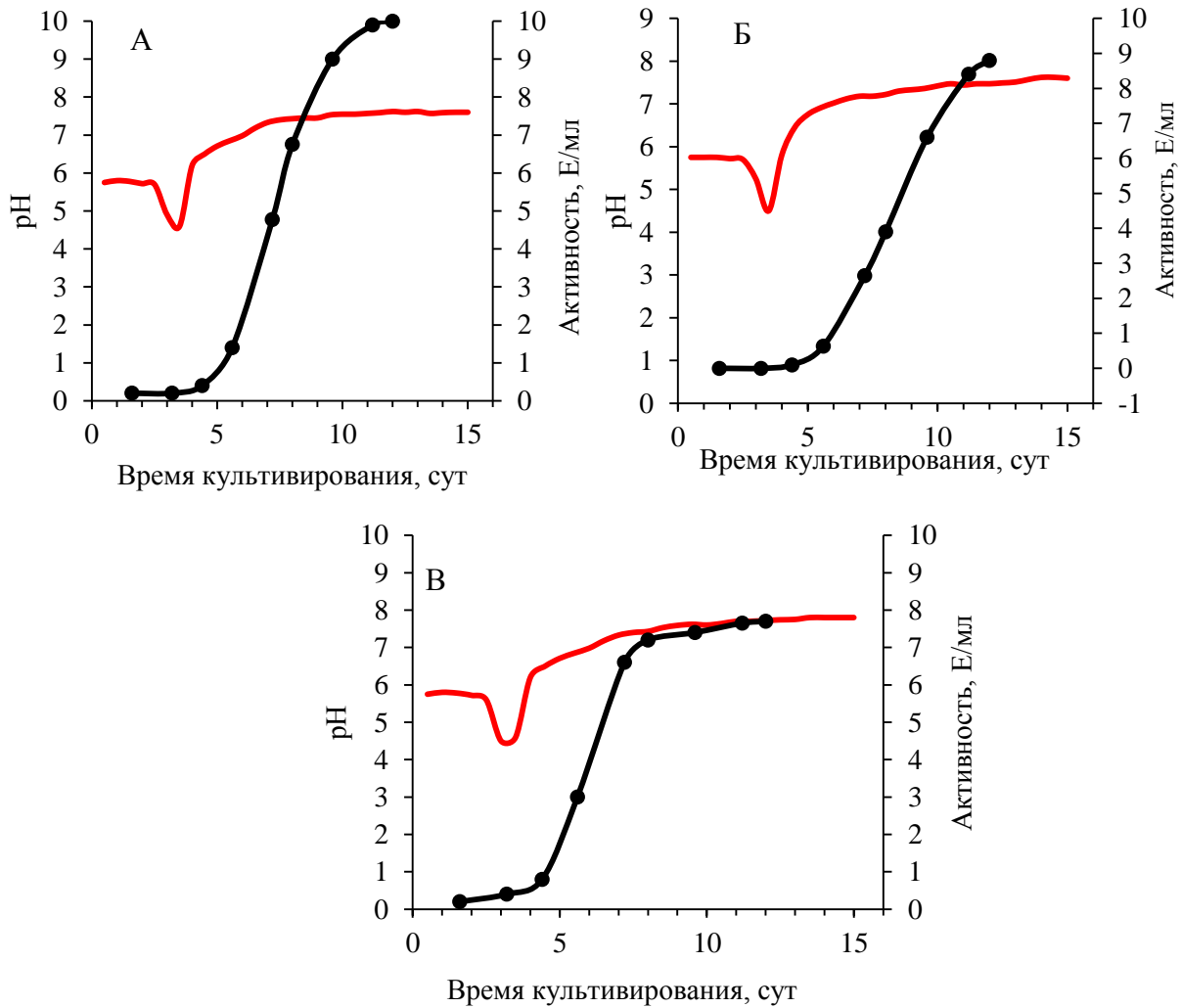


Рис. 9. Влияние температуры на биосинтез ЛО *T.cf. aureoviride* Rifai VKM F- 4268D. Режим проведения ферментации: pO_2 -70-80%, pH - без подтитровки. А- 37 °С; Б - 28 °С; В - 24 °С. —●— - активность ЛО; — - pH.

С учетом этих результатов (рис. 8, 9) и результатов опытов в колбах (рис. 6) были проведены дополнительные исследования по выбору оптимального температурного режима биосинтеза ЛО:

- 1) 28 °С в течение первых 6 сут, 24 °С – с 6 по 15 сут;
- 2) 24 °С в течение первых 6 сут, 28 °С – с 6 по 15 сут;
- 3) 37 °С в течение первых 6 сут; 32 °С – с 6 по 15 сут;
- 4) 37 °С в течение первых 6 сут; 24 °С – с 6 по 15 сут.

В качестве примера рисунке 10 представлены результаты двух вариантов (1 и 4) температурных режимов, при которых получены лучшие результаты. Видно, что в процессе культивирования гриба при 28 °С в течение первых 6 сут с последующим переключением температуры на 24 °С показана меньшая эффективность (128 Е/г субстрата) (рис 10-А), чем при

культивировании при 28 °С в течение всего процесса (142 Е/г субстрата) (рис. 9). Наибольший биосинтез целевого продукта отмечался в случае следующей смены температуры в ходе процесса: температуру ферментации в течение первых 6 сут поддерживали на уровне 37 °С, после чего переключали на 24 °С (рис. 10-Б). При этом время культивирования составляло 12 сут, в реакционной среде накапливалось до 172 Е/г субстрата (12 Е/мл). Другие указанные режимы были менее эффективны.

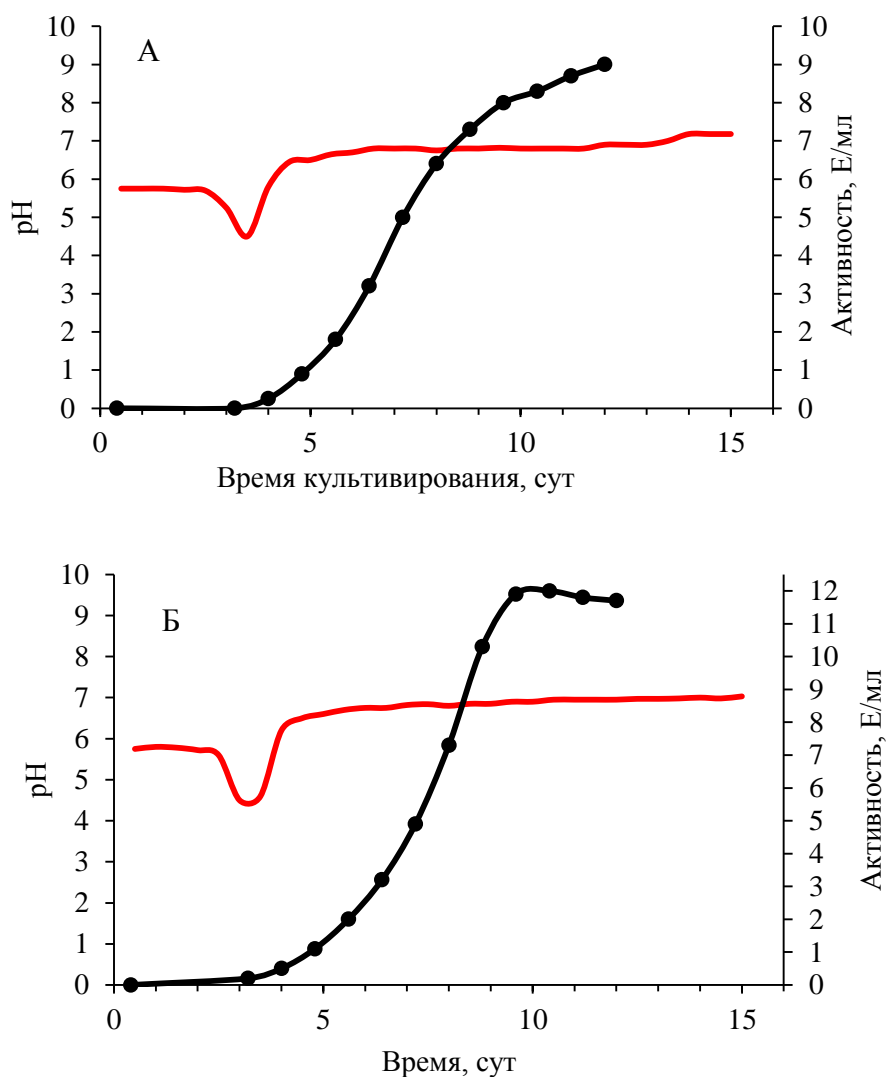


Рис. 10. Оптимизация температурного режима процесса биосинтеза ЛО *T.cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D. Глубинное культивирование в ферментере АНКУМ-2М

—●— -активность фермента, — - рН.

А – 28 °С в течение первых 6 сут, 24 °С – с 6 по 15 сут;

Б – 37 °С в течение первых 6 сут; 24 °С – с 6 по 15 сут.

Таким образом, определены оптимальные режимы аэрации (pO_2), рН и температуры для биосинтеза ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D в биореакторах лабораторного

типа. В найденных оптимальных условиях были проведены процессы ферментации с высоким уровнем биосинтеза ЛО, до 172 Е/г субстрата (12 Е/мл). В литературе отсутствуют данные о получении такого высокого уровня биосинтеза ЛО при любых типах ферментаций.

3.3.6. Проведение стандартных ферментаций. Отработка процесса в 10 л ферментерах

В оптимальных условиях была проведена серия стандартных ферментаций в биореакторах (общим объемом 10 л, рабочим объемом 5 л) с целью наработки целевого продукта и оформления лабораторного регламента. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9. Сводная таблица стандартных ферментаций

№ ферментации	Объем КЖ в конце ферментации, л	Содержание ЛО в КЖ, Е /мл	Общее содержание ЛО в КЖ, Е
1	3,9	11,5	44850
2	4,0	11,8	47200
3	4,0	10,8	43200
4	3,9	11,4	44500
5	4,0	12,0	48000

Можно видеть, что концентрация и общее содержание ЛО в культуральной жидкости серии ферментаций колеблется в незначительных пределах.

Из культуральной жидкости были выделены стандартные образцы фермента, которые на дальнейших этапах работы были использованы для исследования его биологических и физико-химических свойств.

3.4. Выделение и очистка ЛО

3.4.1. Выделение и очистка ЛО методом осаждения белков с помощью сульфата аммония или мембранной ультрафильтрацией

Метод основан на общепринятых подходах и включает в себя 2-х стадийное осаждение ЛО с помощью сульфата аммония с дальнейшей очисткой при помощи гидрофобной и ионообменной хроматографии.

Стадия 1. Культуральную жидкость отделяли от мицелия и отрубей фильтрованием через ткань с последующим центрифугированием. Из фильтрата культуральной жидкости проводили высаливание ЛО сульфатом аммония в интервале 25-60% от насыщения. При насыщении культуральной жидкости до 25% сульфатом аммония осаждалась большая часть балластных белков. Сам фермент ЛО выпадал в осадок при концентрации сульфата аммония 60%. Отсутствие остаточной активности в культуральной жидкости свидетельствовало о полном переходе ЛО в осадок (рис. 11 А).

Стоит отметить, что стадия высаливания белков с помощью сульфата аммония, может быть заменена на мембранную ультрафильтрацию. В этом случае получаемый фильтрат далее наносится на колонку с октил-сефарозой. Этот прием делает процесс выделения ЛО более технологичным (рис. 11 Б).

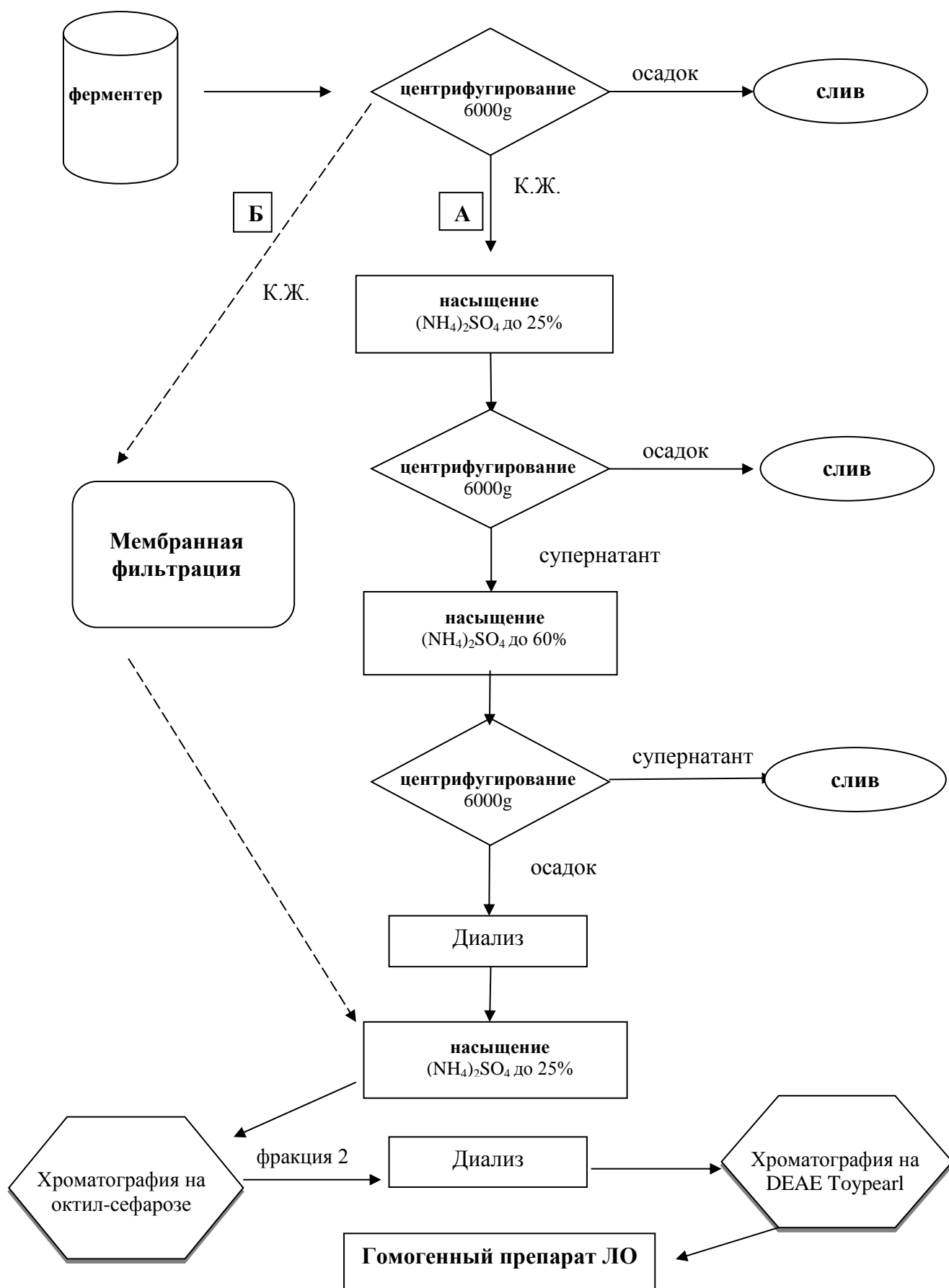


Рис.11. Схема выделения и очистки ЛО.

А- осаждение с помощью сульфата аммония, Б-мембранная фильтрация.

Стадия 2. Очистка на октил-сефарозе. Элюцию проводили ступенчато, изменяя концентрацию сульфата аммония в трис-НСI буфере (0,025 М, рН 8,0) от 25% до 5 % раствора (рис. 12). Из рисунка видно, что основная часть ЛО элюируется с колонки при концентрации сульфата аммония 10 %, тогда как основная масса примесных белков при содержании в элюате сульфата аммония 20 % и 15 % (рис. 12, кривая 2)

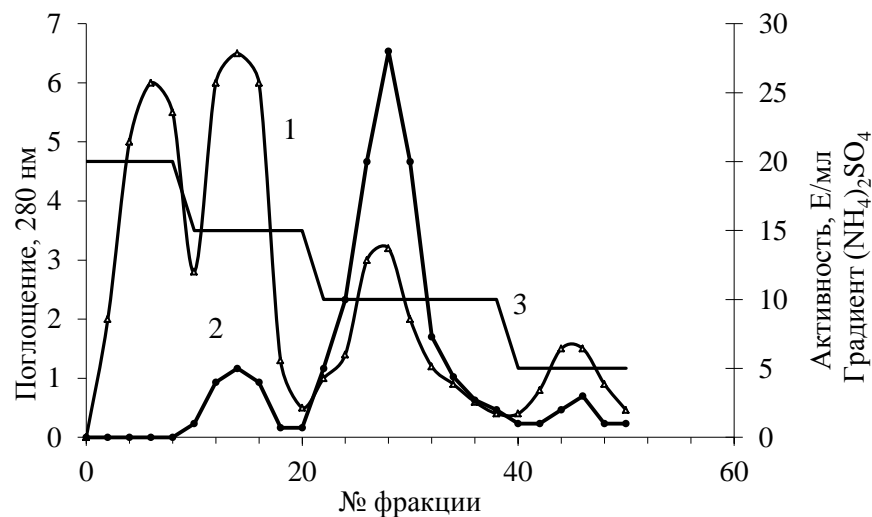


Рис. 12. Гидрофобная хроматография ЛО на колонке с октил-сефарозой: 1 – поглощение при 280 нм; 2 – активность ЛО, Е/мл; 3 – ступенчатый градиент $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Стадия 3. Дальнейшую очистку ЛО проводили с помощью ионообменной хроматографии на DEAE Toypearl HW-55 (рис. 13). ЛО обнаруживалась во фракции, элюируемой 0,2 М NaCl (рис.13, кривая 2).

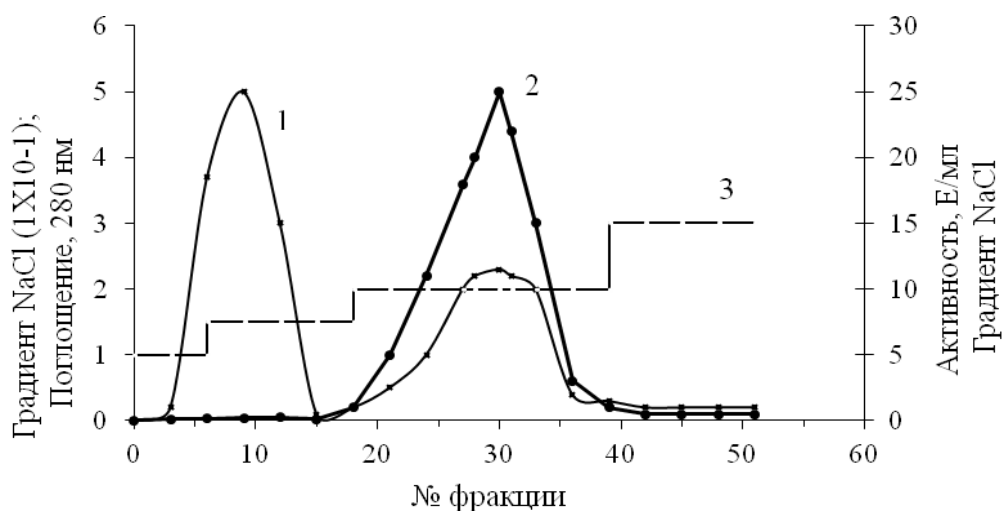


Рис. 13. Ионообменная хроматография ЛО на DEAE Toypearl HW-55

1 – поглощение при 280 нм, 2 – активность, Е/мл, 3 – ступенчатый градиент NaCl.

Данные по выделению и очистке фермента суммированы в таблице 10.

Таблица 10. Очистка ЛО осаждением с помощью сульфата аммония

Стадия	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	25 000	10 000	0,4	0	100
Сульфат аммония, 30-60%	3 000	9 000	3,0	7,5	90
Октил-сефароза CL-4В	150	7 500	50	150	75
DEAE Toypearl HW-55	55	5 445	99	248	60

Ранее немецкими исследователями был предложен эффективный метод для очистки ЛО, обеспечивающий 60% выход фермента, экскретируемого грибом *T. viride* i4: при этом степень очистки составляла 300, а удельная активность ферментного препарата 90 Е/мг (Weber *et al.*, 1994). Недостаток этого метода заключался в использовании большого количества ацетона, до 60 % от объема реакционной среды. При применении ацетона в производственных условиях возникают проблемы экологического характера и техники безопасности на производстве.

Разработанная нами схема очистки (рис. 11) включает 3 стадии, и позволяет получать ЛО с удельной активностью 99 Е/мг, при этом достигается степень очистки – 248, выход 54 %. Этот метод эффективен, технологичен и не предполагает использования органического растворителя, что обеспечивает экологическую безопасность.

Следует подчеркнуть, что предложенная нами схема выделения и очистки ЛО может быть модифицирована: осаждение сульфатом аммония может быть заменено ультрафильтрацией.

Последующие 2 стадии очистки ЛО основываются на упрощенных методах гидрофобной (на октил-сефарозе) и ионообменной (на DEAE Toypearl HW-55) хроматографий. В отличие от предложенной ранее схемы очистки (Kusakabe *et al.*, 1979; Kusakabe *et al.*, 1980), включающей в себя 3 стадии дробного осаждения ЛО сульфатом аммония и 3 стадии хроматографической очистки при помощи ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, наша схема является более простой и быстрой в исполнении.

Чистоту полученной ЛО проверяли с помощью нативного электрофореза, а также при помощи электрофореза в денатурирующих условиях. Наличие в обоих случаях одной полосы белка (рис. 14) свидетельствует об исключительной чистоте полученного препарата фермента.

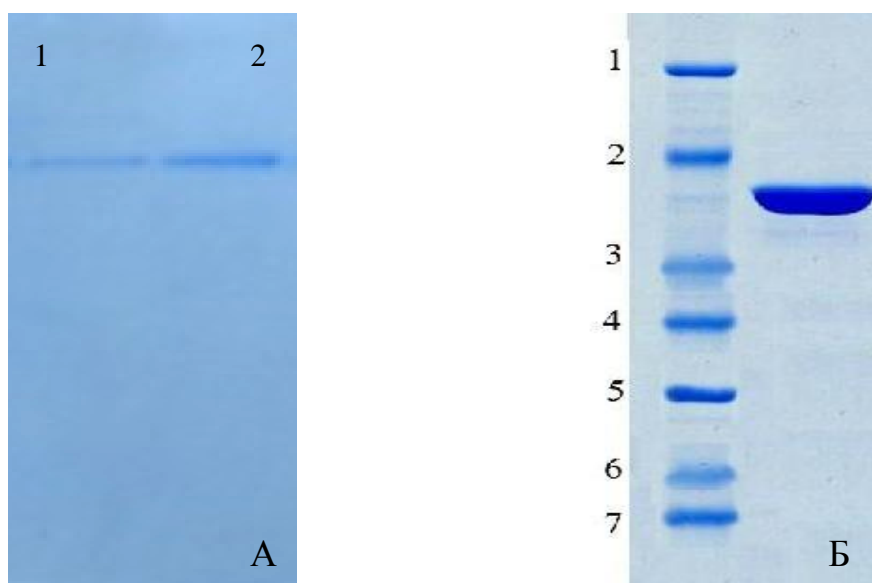


Рис. 14. Электрофореграммы препаратов ЛО, полученных методом осаждения сульфатом аммония. А – в нативных условиях: 1 - 10 мкг белка, 2 - 30 мкг белка; Б – в денатурирующих условиях, 50 мкг белка.

Белки-маркеры молекулярного веса: 1 – β -галактозидаза *E. coli* (116 кДа), 2 - бычий сывороточный альбумин (66,2 кДа), 3 - овальбумин куриного яичного белка (45 кДа), 4 - лактатдегидрогеназа (35 кДа), 5 - эндонуклеаза рестрикции *Bsp. 981 E. coli* (25 кД), 6 - β -лактоглобулин коровьего молока (18,4 кДа), 7 - лизоцим яичного белка (14,4 кДа).

3.4.2. Очистка ЛО с использованием медь-имидазольного осаждения

С целью повышения эффективности процесса получения целевого продукта был разработан более технологичный способ выделения и очистки ЛО, основанный на обратимом связывании фермента с ионами Cu^{2+} . Оригинальность технического решения заключалась в том, что на стадии осаждения фермента из культуральной жидкости вместо общепринятых методов осаждения сульфатом аммония, этанолом, ацетоном или другими агентами, фермент осаждали простыми или комплексными солями меди.

Аффинная металл-хелатная хроматография ЛО в литературе не описана, однако известно (Лукашева и Березов, 2002), что некоторые ионы переходных металлов, в том числе ионы Cu^{2+} , эффективно и обратимо связывают ЛО. На основании этих данных мы предположили возможность очистки фермента на основе взаимодействия ЛО с ионами Cu^{2+} .

Было показано, что ЛО взаимодействовала с неорганическими солями меди (CuSO_4 или CuCl_2), переходила в нерастворимое состояние, теряя при этом 100% активности. Добавление комплексонов таких, как ЭДТА и трилон Б, не приводило к освобождению фермента и восстановлению активности.

Мы предположили, что комплексные соли меди (медь-имидазольный комплекс) могли бы «имитировать» ионы Cu^{2+} в состоянии связывания с металл-хелатными сорбентами.

Оказалось, что при замене неорганических солей меди на медь-имидазольный комплекс также происходило связывание ЛО, образование осадка и полное исчезновение ЛО активности в реакционной смеси. Но при этом добавление к осадку ЭДТА приводило к полному освобождению фермента и восстановлению активности ЛО до первоначального уровня.

В общем виде очистку ЛО осуществляли следующим образом (рис. 15):

Стадия 1. Культуральную жидкость отделяли от мицелия и отрубей фильтрованием через ткань и центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а к супернатанту при активном перемешивании добавляли комплексное соединение меди с имидазолом до конечной концентрации 10 мМ. Образовавшийся через 2 ч инкубации осадок, содержащий ЛО, собирали центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. На этой стадии в осадок переходило более 95 % активности фермента. Собранный осадок растворяли в 100 мл 50 мМ ЭДТА (рН 7,0), а нерастворимые компоненты осадка удаляли путем центрифугирования при 10000 g в течение 20 мин. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 25% от насыщения и концентрированный (1 М) трис-НС1 до концентрации 0,025 М (рН 7,5) и оставляли на 1 ч при 4 °С. Образовавшийся осадок удаляли путем центрифугирования при 10000 g в течение 20 мин.

Фермент, находящийся в супернатанте, подвергали дальнейшей очистке, включающей гидрофобную хроматографию на октил-сефарозе (аналогично стадии 2, п. 3.4.1) и ионообменную хроматографию на DEAE Toyperl HW-55 (аналогично стадии 3, п. 3.4.1).

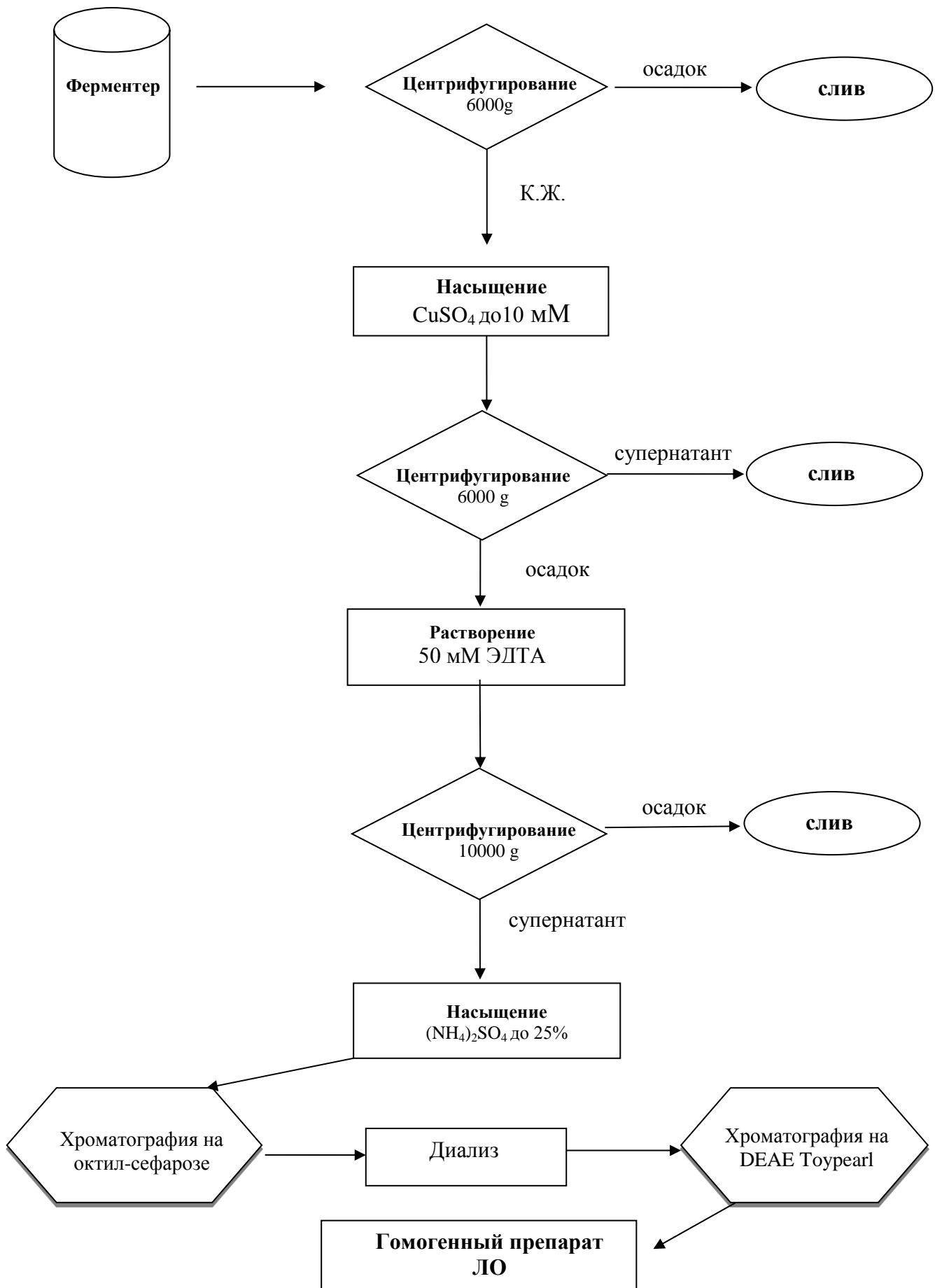


Рис.15. Схема выделения и очистки ЛО при помощи комплексных соединений меди.

Наличие фермента и степень его очистки проверяли электрофоретически после каждой стадии. На рис. 16 представлена электрофореграмма с белковыми профилями каждого шага очистки ЛО.

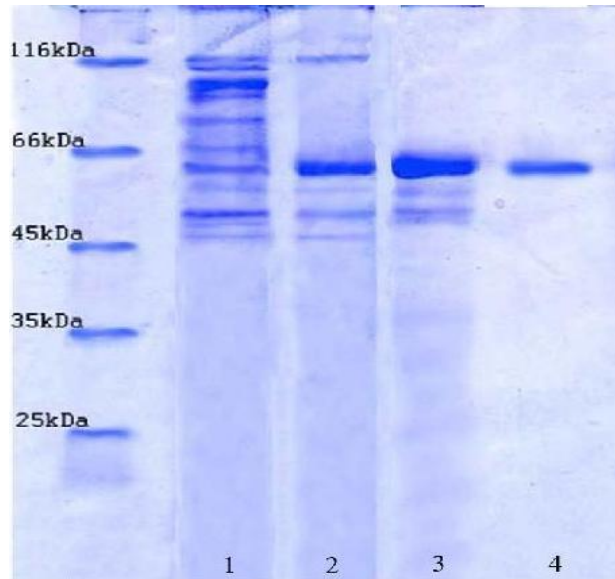


Рис. 16. Электрофореграмма стадий очистки препарата ЛО с помощью осаждения ионами меди.

1 – культуральная жидкость на 12-ые сут роста, 2 – супернатант, полученный после растворения осадка ЛО с ионами меди в 50 мМ ЭДТА, 3 – элюат после проведения гидрофобной хроматографии, 4 – гомогенный препарат ЛО после проведения ионообменной хроматографии.

Белки – маркеры молекулярного веса: 1 – β -галактозидаза *E. coli* (116 кДа), 2 - бычий сывороточный альбумин (66,2 кДа), 3 - овалбумин куриного яичного белка (45 кДа), 4 - лактатдегидрогеназа (35 кДа), 5 - эндонуклеаза рестрикции Bsp. 981 *E. coli* (25 кДа).

Результаты 3-стадийной очистки ЛО суммированы на таблице 11.

Таким образом, в результате трехстадийной очистки ЛО с использованием метода осаждения фермента медь-имидазольным комплексом, получен гомогенный препарат фермента с удельной активностью, равной 100 Е/мг белка при степени очистки 250 раз и конечным выходом 65 %.

Следует отметить, что при использовании данного подхода по сравнению с традиционным осаждением сульфатом аммония, происходит уменьшение объема обрабатываемой жидкости (в 100 раз), уменьшение потерь активного фермента, а также сокращение числа стадий выделения (дробное высаливание фермента сульфатом аммония), что

предполагает существенное снижение себестоимости продукта по сравнению с мировыми аналогами.

Таблица 11. Стадии очистки ЛО с помощью медь-имидазольного осаждения

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е /мг белка	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	25 000	10 000	0,4	0	100
Осаждение Си-имидазол, 10 мМ	1780	9500	6,4	16	95
Гидрофобная хроматография на октил-сефарозе	216	7800	36	90	78
Ионообменная хроматография DEAE Toyperl HW-55	65	6500	100	250	65

Кроме того, данный способ очистки ЛО имеет гибкую схему исполнения, что дополняет его преимущества по сравнению с уже известными схемами очистки и повышает перспективность его использования.

3.5. Физико-химические свойства ЛО

3.5.1. Молекулярная масса ЛО

С помощью электрофореза в нативных условиях в градиенте ПААГ, а также методом гель-фильтрации определена молекулярная масса ЛО, составляющая 117 кДа. (рис. 14, А). Методом денатурирующего электрофореза в ПААГ была определена масса 2 гомогенных субъединиц ЛО (рис. 14, Б), которая соответствовала 57-58 кДа.

3.5.2. Спектральные характеристики ЛО

Спектр выделенного нами фермента ЛО оказался типичным для флавопротеина, с максимумами при 278, 390 и 465 (плечо 490) нм (рис. 17 А и Б, кривые 1). В присутствии лизина пики при 390 и 465 нм исчезали (рис.17 Б, кривая 2). Через 5-6 минут после исчерпания лизина в присутствии кислорода спектр полностью восстанавливался.

На основании этих данных мы предположили, что в качестве простетической группы ЛО выступает флавин, который при связывании фермента с лизином обратимо изменяет свое состояние из окисленного в восстановленное.

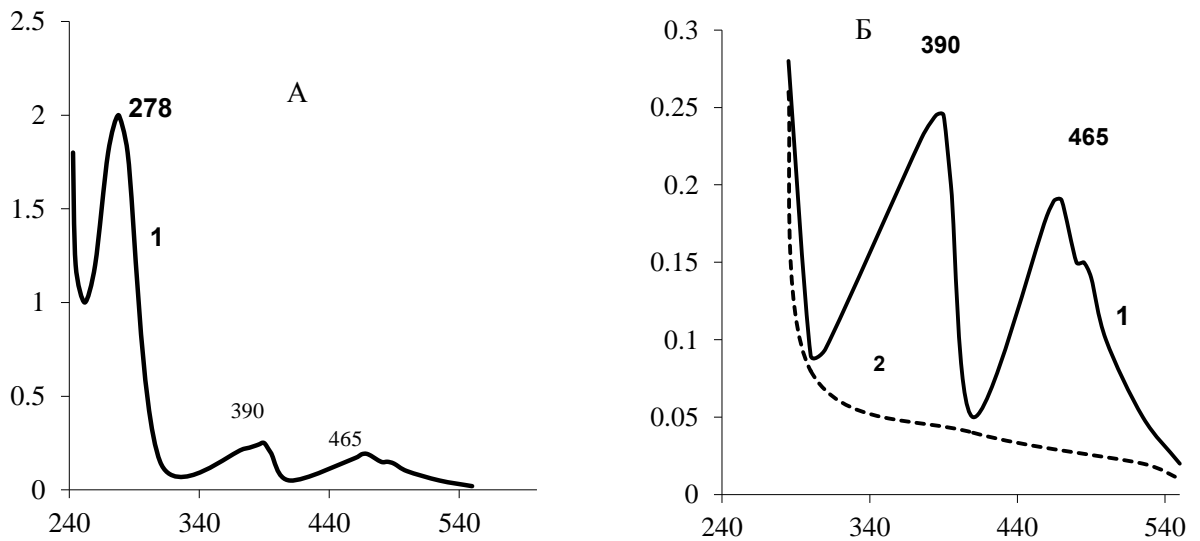


Рис. 17. Спектр поглощения ЛО (0,5 мг/мл ЛО в трис-НСl, 0,025 М, рН 8,0).

А - в отсутствии лизина; Б - в присутствии лизина (0,5 мМ).

3.5.3. Кофактор ЛО

3.5.3.1. Определение наличия простетической группы ЛО спектрофотометрическим методом

Для определения простетической группы фермента ЛО был проанализирован супернатант, полученный после денатурирования 2 мг ЛО. Спектры супернатанта были идентичны спектрам ФАД. Измеренное количество ФАД составляло 39,2 нмоль (коэфф. молярной абсорбции = 11,300), что соответствовала 2 молекулам ФАД на 1 молекулу фермента.

Эти результаты согласуются с данными о количестве молекул ФАД у соответствующих ферментов, выделенных из других штаммов *T. harzianum* (Kusakabe *et al.*, 1980; Berezov *et al.*, 1988; Weber *et al.*, 1990).

3.5.3.2. Идентификация кофактора ЛО с помощью ВЭЖХ

На рис. 18 представлены результаты ВЭЖХ анализа кофермента в исследуемом препарате ЛО. Как видно из хроматограммы (рис. 18 Б), время выхода кофермента ЛО совпадало со временем выхода с колонки маркерного раствора ФАД, а время выхода ФМН отличалось от исследуемого образца. Исходя из представленных данных, можно предположить, что именно ФАД является коферментом ЛО.

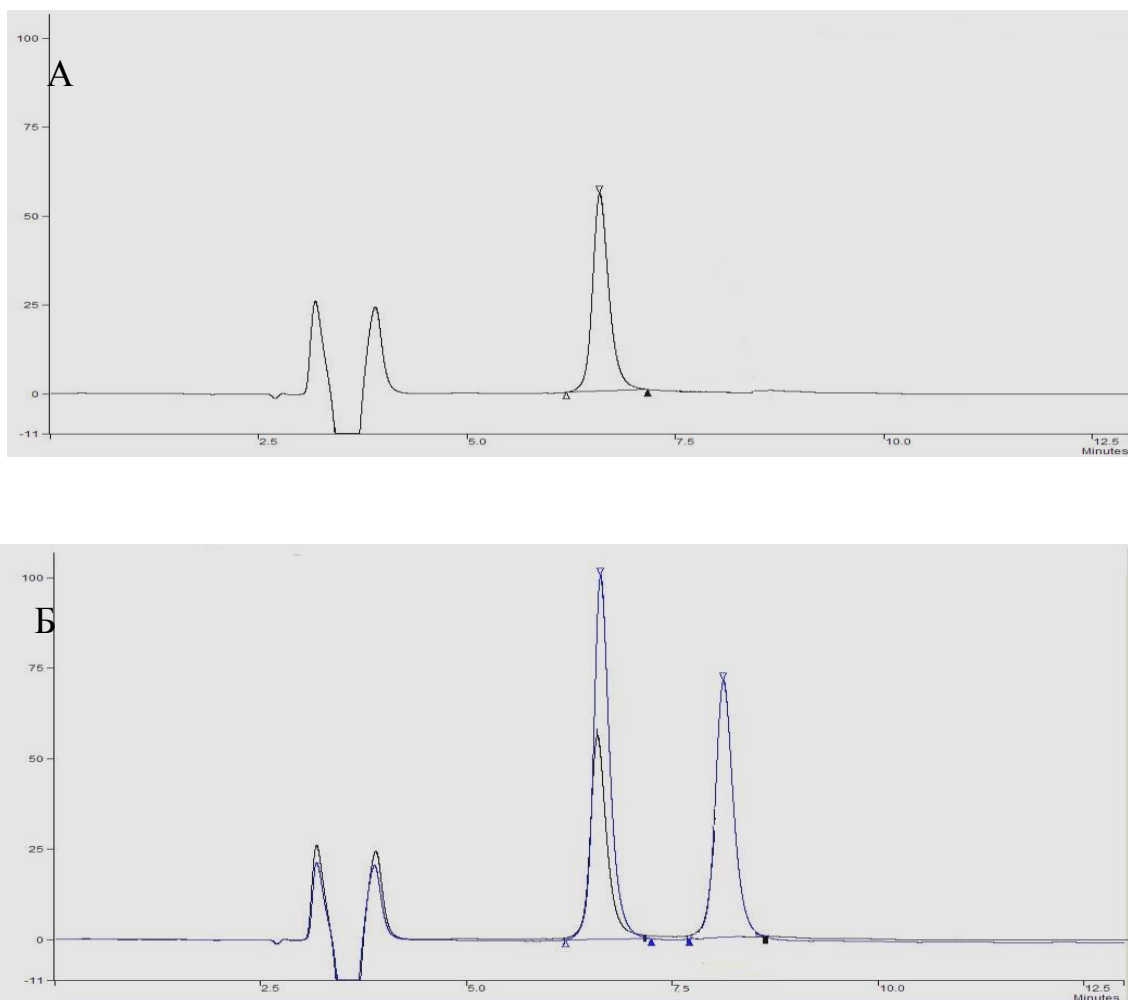


Рис. 18. ВЭЖХ анализ кофермента ЛО.

А – время выхода анализируемого кофермента ЛО $RT=6,6$ min,

Б – наложение хроматограмм кофермента ЛО и стандартного раствора ФАД ($RT=6,7$ min), ФМН ($RT=8,1$ min).

Данные результаты согласуются с вышеприведенными данными, полученными при спектрофотометрическом изучении простетической группы препарата ЛО (п. 3.5.3.1).

3.5.4. Наличие изоферментов ЛО

Ранее было выявлено наличие изоформ ЛО в культуральной жидкости гриба *T. harzianum* (Веса и др., 1996). Фермент и его изоформа были получены в гомогенном состоянии. Авторами было показано отличие изоформ по молекулярной массе (соответственно 120 и 100 кДа) и по удельной активности при использовании лизина в качестве субстрата (соответственно 90-95 и 17-20 МЕ/мг). Вторая форма ЛО, вероятно, представляла собой продукт частичного протеолиза нативной ЛО.

С помощью нативного электрофореза в градиенте ПААГ нами не было обнаружено изоформ ЛО (рис. 19).

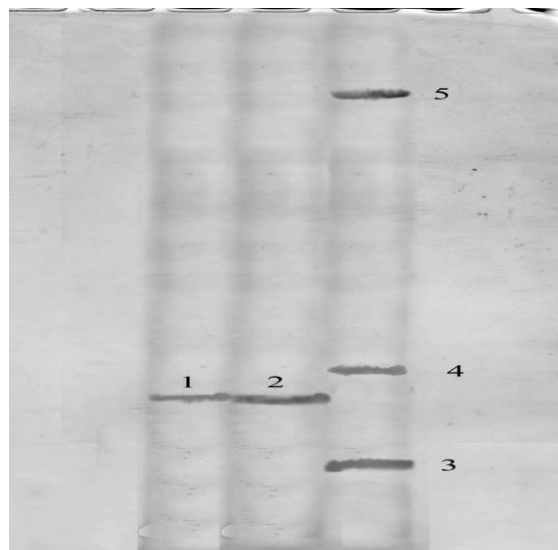


Рис.19. Нативный электрофорез в градиенте ПААГ образцов ЛО. 1 – 15 мкг ЛО (116 кДа), 2 - 25 мкг ЛО (116 кДа), 3- бычий сывороточный альбумин (66,2 кДа), 4 - алкогольоксидаза (140 кДа), 5 - апоферритин (440 кДа).

3.5.5. Зависимость активности ЛО от pH

При использовании орто-дианизидинового метода анализа показано что максимальная активность фермента проявлялась при pH 7,8-8,2 (рис. 20-А). Установленный pH-оптимум отличается от pH-оптимумов ЛО, выделенных из других грибов рода *Trichoderma*. Например, pH-оптимум ЛО из *T. viride* Y244 (определенный аналогичным способом), находится в более широком диапазоне значений pH, от 7,4 до 9,2, а у *T. harzianum* \approx pH 7,4 (Kusakabe *et al.*, 1980).

При использовании полярографического метода (рис. 20-Б) было показано, что максимальная активность фермента из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D проявлялась в диапазоне значений pH от 4,5 до 9,0. Сравнивая результаты, представленные на рис. 18-А и 20-Б, можно видеть, что pH-оптимум зависит от выбранного метода анализа. Не исключено, что

метод измерения активности ЛО с помощью орто-дианизидина (рис. 20-А) дает погрешность, вероятно, за счет влияния рН на активность используемых компонентов среды измерения - пероксидазы и орто-дианизидина.

Полярнографический метод, позволяющий регистрировать количество кислорода, непосредственно потребленного при расщеплении лизина, в данном случае представляется более точным и адекватным, так как отражает непосредственно активность фермента, не зависимо от возможных модификаций других компонентов реакционной смеси.

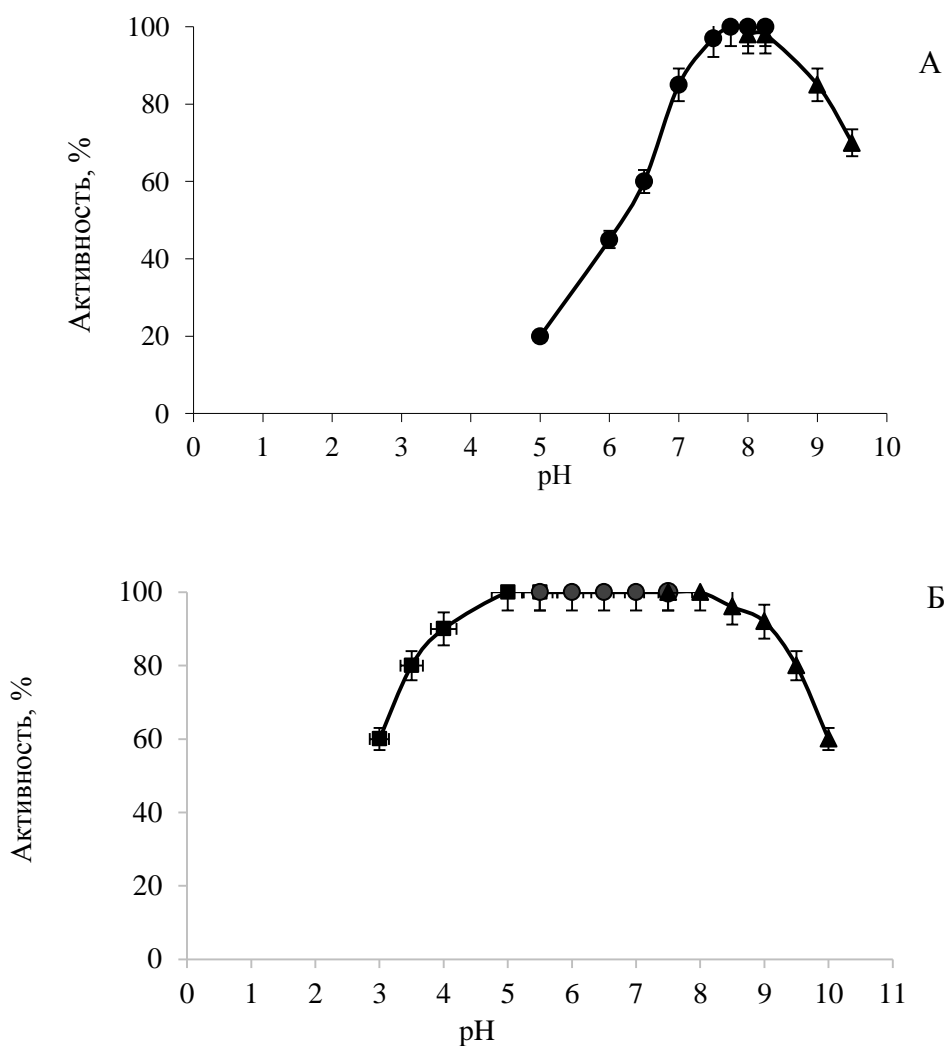


Рис. 20. Влияние рН на активность ЛО. А - спектрофотометрический метод, Б - полярографический метод. ■--■ рН 3,0-6,0; 0,05 М натрий-ацетатный буфер, ●--● рН 6,0-8,5; 0,05 М трис-фосфатный буфер; ▲--▲ рН – 8,0-9,5; 0,05 М глициновый буфер.

3.5.6. Субстратная специфичность ЛО

К ферментным препаратам для промышленного и медицинского применения предъявляется ряд определенных требований, среди которых наряду с биологической высокой

активностью и низкой токсичностью обязательны: узкая субстратная специфичность, стабильность и др.

В качестве субстратов для ЛО были использовали L – изомеры лизина, лейцина, фенилаланина, аланина, аспарагина, аргинина, гистидина, орнитина, глутамина, треонина, тирозина, изолейцина, валина, а также глицин, D-лизин и 2,6-диаминопимелиновую кислоту. Концентрация субстратов составляла 0,5 мМ, ЛО – 4,0 мкг/мл.

Было показано, что фермент действует практически только на L-лизин. Незначительную активность отмечали в присутствии аргинина (5,8 %) и L-орнитина (8,3 %) а также производного лизина - 2,6-диаминопимелиновой кислоты (12 %). В присутствии остальных аминокислот, а также D-лизина активность фермента была равна нулю.

Таким образом, выделенная ЛО, является высокоизбирательным и абсолютно L-стереоспецифичным ферментом. Это позволяет предположить возможность его использования для создания биохимических тестов на L-лизин, а также в биоинженерии белков. Полученные результаты согласуются с литературными данными. Соответствующие ферменты, выделенные из *T. viride* Y 244-2 (Kusakabe *et al.*, 1980), *T. viride* i4 (Weber *et al.*, 1994), *T. harzianum* Rifai 1969 (Березов, 2005), катализировали также, в основном, окислительное дезаминирование L-лизина.

3.5.7. Кинетические характеристики ЛО

На рис. 21 представлены результаты зависимости скорости реакции дезаминирования лизина от концентрации фермента (при избытке субстрата).

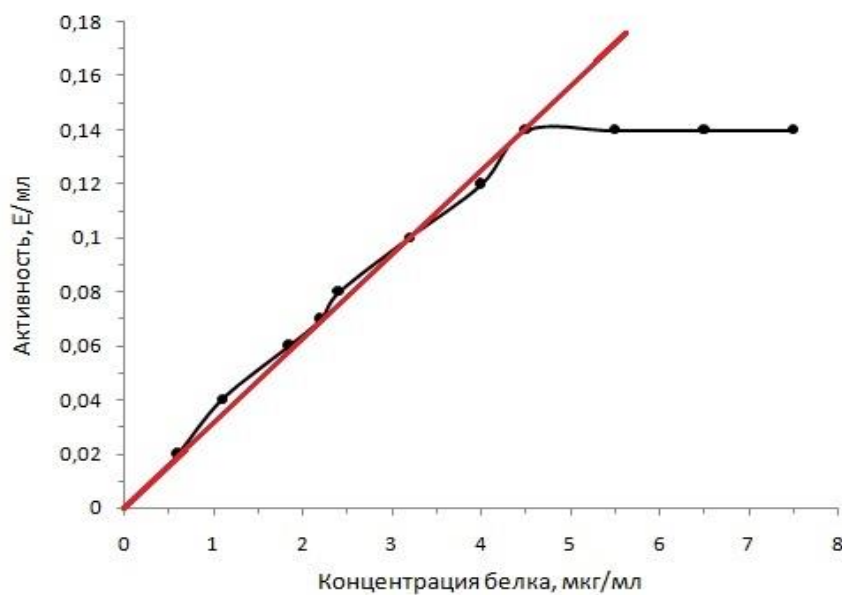


Рис. 21. Зависимость активности ЛО от ее концентрации.

Из представленных данных видно, что при концентрациях ЛО до 4,5 мкг/мл эта зависимость имеет линейный характер. В пределах этих концентраций были проведены все последующие кинетические исследования ЛО.

Для определения кинетических особенностей ЛО была исследована зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. На рис. 22 показано, что функция насыщения фермента субстратом представлена в виде сигмоидной кривой.

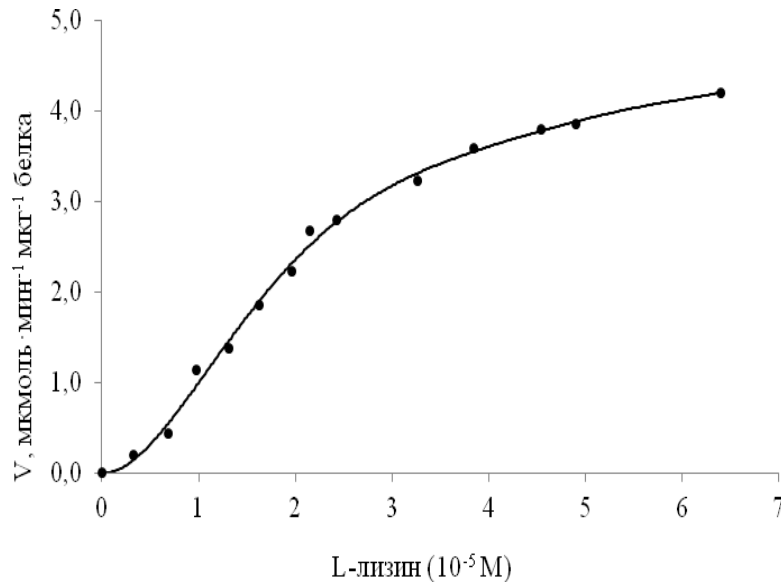


Рис 22. Зависимость скорости реакции дезаминирования (мкмоль/мин·мкг белка) от концентрации лизина.

Как было показано выше, ЛО является гомодимерным ферментом с идентичными субъединицами (М.М. 57,5 кДа), что предполагает кооперативность связывания субстрата. Исходя из этого, мы использовали трехпараметрическое уравнение Хилла:

$$v_0 = V \cdot s^h / (s^h + s_{0,5}^h)$$

где v_0 – начальная скорость реакции, V – максимальная скорость реакции, $s_{0,5}$ – концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине от V , h – коэффициент Хилла.

Безразмерный коэффициент Хилла, как известно (Kurganov, 1982), характеризует количество субъединиц фермента, которые участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса, и одновременно силу их связывания в комплексе.

Обработка этих данных с помощью программы «Statistics» (SigmaPlot 10) (Krupyanko *et al.*, 2015) позволила получить следующие результаты: $h = 2,05 \pm 0,15$, $V = 4,36 \pm 0,14$

мкмоль·мин⁻¹ мкг⁻¹ белка и $S_{0.5} = 2,03 \pm 0,07 \cdot 10^{-5}$ М. h показывает положительную кооперативность участия двух субъединиц в образовании субстрат-ферментного комплекса.

Из уравнения Хилла понятно, что $S_{0.5}$ будет отражать константу Михаэлиса только тогда, когда $h=1$.

$$v_0 = Vs^h/(s^h + s_{0.5}^h) \rightarrow Vs/(s + K_m) \rightarrow V/(1 + K_M/s)$$

Так как h не равна 1, то параметр $S_{0.5}$ не может быть использован для характеристики связывания субстрата с активным центром фермента. Кинетические исследования двухсубъединичных ферментов, включая ЛО и другие оксидазы L-аминокислот, описаны в современной литературе, но аспекты кооперативности для математического выражения кинетики реакции при этом не учитывались. Были оценены константы Михаэлиса-Ментен (K_m) для ферментативных реакций, контролируемых трехпараметрическим уравнением Хилла, а не двухпараметрическим уравнением Михаэлиса-Ментен (Schnell, 2014). Для оценки K_m мы использовали уравнение, выведенное ранее для кооперативных (аллостерических) ферментов с использованием коэффициента Хилла (Krupyanko, 2015)

$$K_{m(A)} = s_{0.5(A)}/h = s_{0.5(A)}/(1+1).$$

Подстановка экспериментальных данных из рис. 20 в это уравнение позволяет вычислить константу:

$$K_{m(A)} = 2,03[1/(1_A + 1_B)] \cdot 10^{-5} \text{ М} = 2,03(1/2) \cdot 10^{-5} \text{ М} = 1,015 \cdot 10^{-5} \text{ М}$$

Полученное значение K_m указывает на высокую прочность связывания субстрата с активным центром каждой субъединицы ($\approx 10^{-5}$ М). Чем больше емкость фермента, тем выше каталитическая активность, а, следовательно, и терапевтическая эффективность.

С другой стороны, высокая афинность (сродство) к субстрату и высокая специфичность – существенны для биоконтроля и симбиотических взаимодействий между грибом-продуцентом и растением, что может предопределять физиологическую роль внеклеточного фермента ЛО.

3.5.8. Зависимость активности ЛО от ионной силы раствора

В настоящей работе впервые исследована зависимость активности ЛО от ионной силы раствора. Из результатов, представленных на рис. 23, видно, что максимальная активность отмечалась при $I = 0,225$, при концентрации NaCl, равной 0,22-0,23 М (0,9 %). В области больших концентраций соли отмечалось экспоненциальное падение активности. Следует отметить, что указанная концентрация NaCl соответствует таковой в плазме крови и в физрастворе.

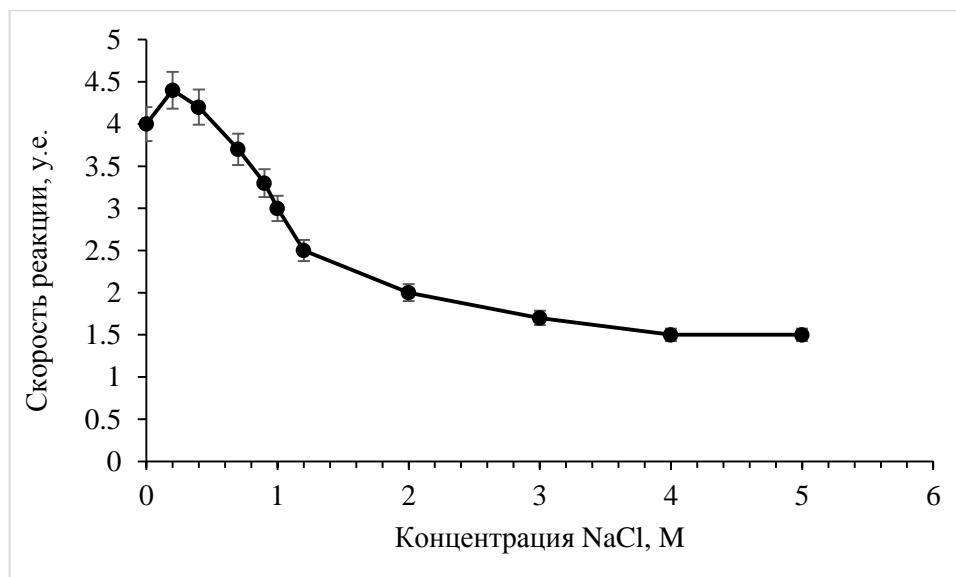


Рис. 23. Зависимость начальных скоростей (v_0) дезаминирования L-лизина от концентрации NaCl.

3.5.9. Зависимость активности ЛО от температуры

Результаты определения зависимости активности ЛО от температуры представлены на рис. 24-А. Показано, что наибольшая активность фермента в реакционной среде наблюдалась при 37 °С. Найденный температурный оптимум совпадает с таковым, определенным ранее для ЛО из *T. viride* (Kusakabe *et al.*, 1979).

3.5.10. Энергия активации ЛО

Для определения энергии активации данные, представленные на рис. 24-А, были преобразованы в координатах Аррениуса (рис. 24 Б). Обработка этих данных с использованием уравнения Аррениуса

$$\lg V = -\frac{E}{2,303RT} + A,$$

позволила рассчитать энергетический барьер (E_a) реакции дезаминирования L-лизина, катализируемого ЛО, где: V - максимальная скорость реакции, R - газовая постоянная 1,987 кал/моль·град, 2,303 - постоянная интегрирования, A - относительная активность, T - температура, °К.

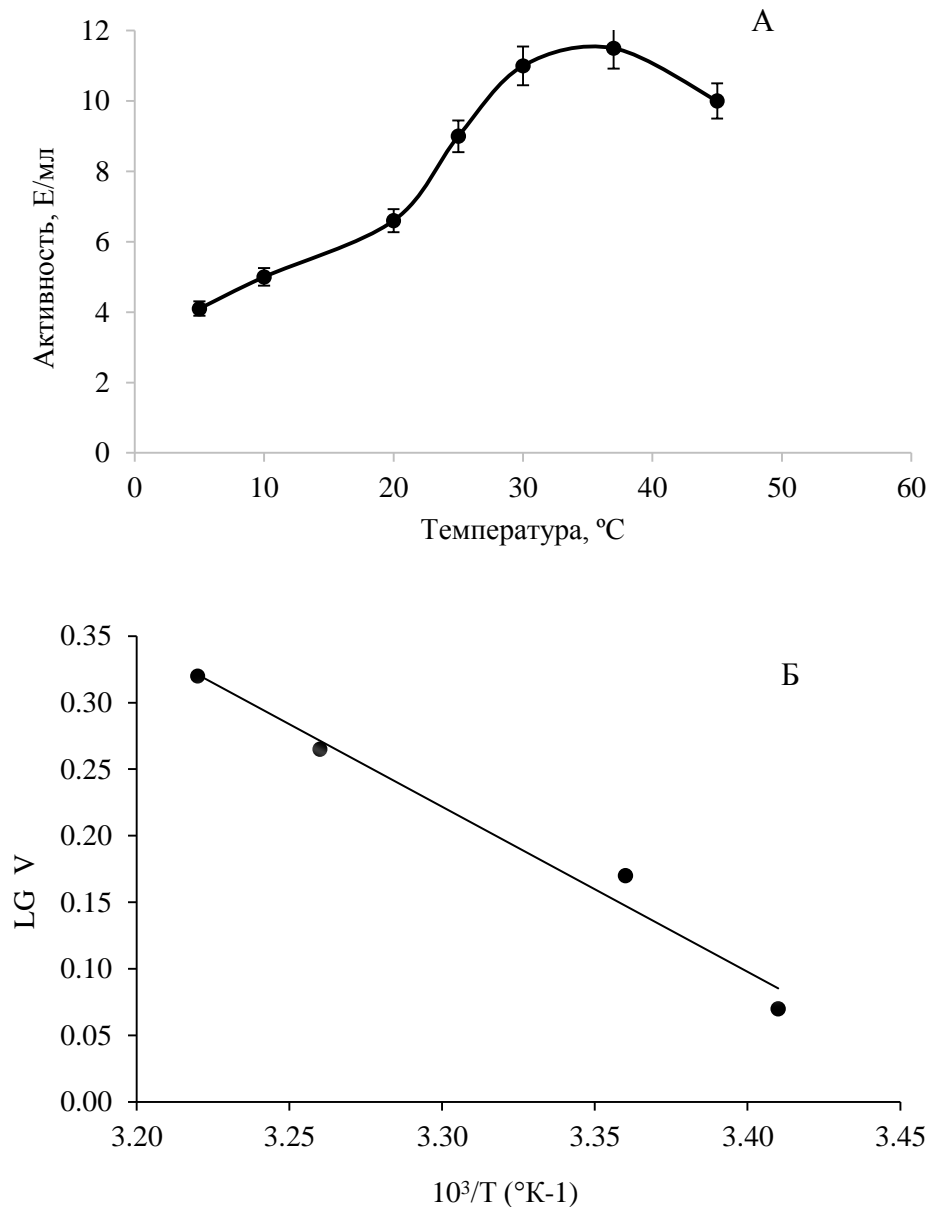


Рис. 24. Зависимость активности ЛО от температуры.

А – в прямых координатах,

Б - в координатах Аррениуса.

Рассчитанная величина энергии активации реакции составила $E_a = 2,61$ ккал/моль. Такая низкая энергия активации свидетельствует о высокой каталитической активности фермента.

Для ЛО из *Trichoderma viride* (Kusakabe *et al.*, 1979) величина энергии активации реакции дезаминирования L-лизина была значительно выше: $E_a = 8,965$ ккал/моль, (пересчет от кД/моль), что может быть обусловлено двумя фактами. Во-первых, авторы упомянутой статьи не рассматривали возможности диссоциации, выделенной ими ЛО на субъединицы (обсуждаются величины K_m и V констант недиссоциируемого фермента), и, во-вторых, в работе

не указан интервал потери начального времени регистрации реакций, что может приводить к значительным снижениям активности подобных ферментов (Смирнова, Березов, 1988).

3.5.11. Термостабильность ЛО

На рис. 25 представлена зависимость активности ЛО от температурной обработки в течение 30 мин. Из полученных данных видно, что фермент стабилен в диапазоне температур от 28 до 50 °С. При повышении температуры выше 50 °С имела место частичная (50-60 °С) или полная (73 °С) потеря активности фермента, что, вероятно, обусловлено денатурацией белковой молекулы ЛО.

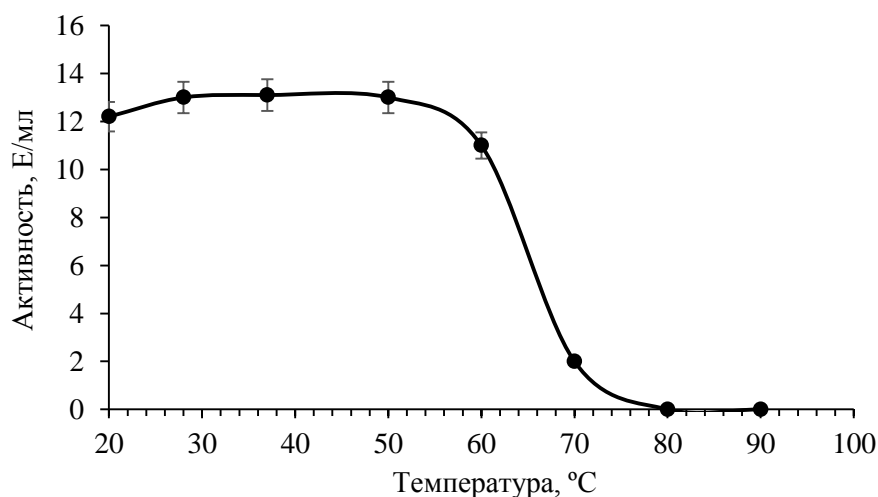


Рис. 25. Термостабильность ЛО (активность ЛО измерена при 22 °С).

Кроме того, хранение ЛО в лиофилизованном состоянии в течение 2 лет при -18 °С, а также при комнатной температуре в течение, по крайней мере, 3 недели в стерильных условиях не вызвало заметной потери ферментативной активности.

3.5.12. Устойчивость ЛО к действию протеолитических ферментов

Полученные нами стандартные образцы ЛО были переданы в ГУ РОНЦ им. Блохина, для проведения доклинических исследований в различных лекарственных формах, включая растворы для инфузионного и перорального введения. Однако общеизвестно, что все белки при прохождении желудочно-кишечного тракта подвергаются протеолитическому расщеплению. Однако в тоже время обнаружено, что ряд ферментов после перорального введения в каталитически активном состоянии попадает в кровоток (Liu *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2006). В связи с этим закономерен вопрос об устойчивости фермента к действию протеаз.

Устойчивость фермента к протеазам делает возможной перспективу создания на основе ЛО эффективного лекарственного препарата.

В настоящей работе было изучено действие гидролитических ферментов – трипсина, химотрипсина и проназы на активность ЛО (рис. 26).

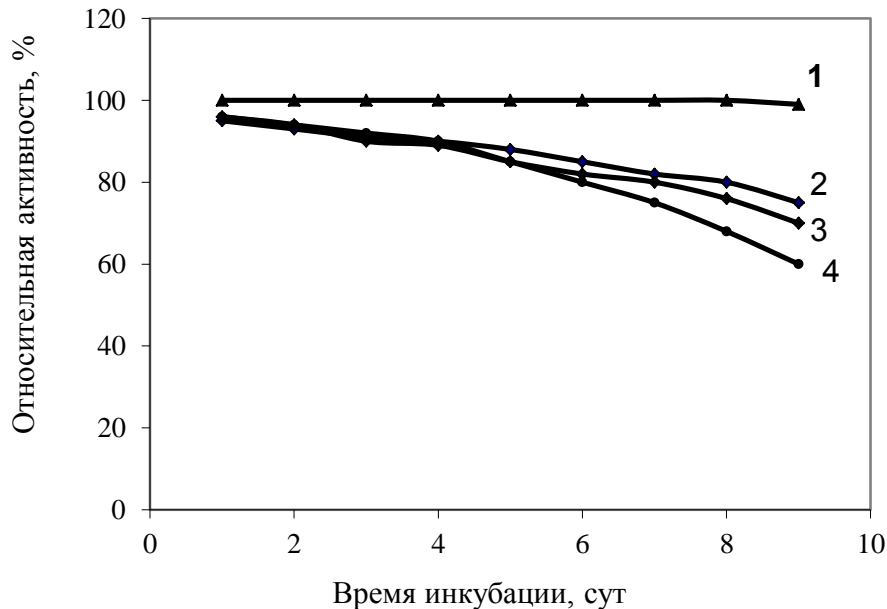


Рис. 26. Устойчивость ЛО к протеолитическим ферментам.

1 – без протеаз (контроль), 2 – в присутствии трипсина (2 мг/мл), 3 – в присутствии химотрипсина (2 мг/мл), 4 – в присутствии проназы (2 мг/мл).

ЛО инкубировали в стерильных условиях в Трис-фосфатном буфере, 50 мМ (рН 6,8), при 22 °С в течение 10 сут.

Установлено, что ЛО наиболее устойчива к действию проназы (1 Е/мл): после 10 сут выдерживания в присутствии этого фермента активность ЛО уменьшалась на 60 %, в присутствии трипсина или химотрипсина (1 Е/мл) 75 % и 70 %, соответственно.

Полученные результаты коррелируют с другими сообщениями о наличии устойчивости к протеазам у оксидаз L-аминокислот (Butzke *et al.*, 2005).

Трипсин преимущественно гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина. Химотрипсин наиболее активен в отношении пептидных связей, образованных карбоксильными группами ароматических аминокислот. Полученные нами результаты дают возможность предположить, что связи, образованные как гидрофобными аминокислотами, так и положительно заряженными аминокислотами в молекуле ЛО не доступны для действия протеаз. Возможно, эти связи локализованы внутри белковой глобулы. Такое предположение находится в соответствии с тем фактом, что ЛО имеет

изоэлектрическую точку 4,25 (Лукашева, Березов, 2002). За счет этого при физиологических значениях pH молекула этого фермента несет отрицательный заряд, что обеспечивает появление на поверхности фермента боковых радикалов отрицательно заряженных аминокислот.

3.5.13. Устойчивость ЛО к действию ДСН, гуанидинхлорида и мочевины

Было изучено действие ДСН на каталитические свойства ЛО. Обнаружено, что этот неионогенный детергент в концентрации до 5% не оказывал влияния на активность фермента. Ионогенные детергенты, такие, как твин-80 или тритон X-100, в концентрации 3 % также не снижали активности ЛО. В присутствии мочевины в концентрации до 8 М также не отмечалось заметной потери активности ЛО в течение 3 ч.

Потеря каталитических свойств имела место в присутствии гуанидинхлорида, через 1 ч инкубации сохранялось 30% от исходной активности, а через 2 ч активность падала до нуля.

Эти результаты свидетельствуют о высокой стабильности молекулы фермента (таблица 13), что согласуется с данными изучения структуры ЛО методом протонного магнитного резонанса, представленными ниже (п. 3.5.15).

Таким образом, для полученного нами ферментного препарата ЛО характерны высокая активность - 99 Е/мг белка, узкая субстратная специфичность и высокая стабильность: при хранении, устойчивость к действию детергентов, хаотропных агентов, а также к действию протеаз и температуры.

3.5.14. Спектр протонного магнитного резонанса

Для изучения структурных характеристик белковой молекулы ЛО были проведены исследования спектров фермента методом протонного магнитного резонанса. Было выявлено, что спектр протонного магнитного резонанса, является характерным для глобулярных белков с молекулярной массой более 40 кДа. В области 6-5,5 мд имеются небольшие по интенсивности сигналы, принадлежащие α -СН протонам, находящимся в β -структурных участках полипептидной цепи.

Спектр КД в дальнем ультрафиолете (190-240 нм), отражающий вторичную структуру полипептидной цепи, показал наличие α -спиральных и β -структурных участков. Высокое содержание последних (40% белковой молекулы) обеспечивает высокую стабильность ЛО: устойчивость к действию температуры, детергентов и протеолитических ферментов (табл. 13).

Спектр КД в ближнем ультрафиолете (260-280 нм) показал пространственную анизотропию колец ароматических аминокислотных остатков, связанную с образованием

гидрофобных кластеров внутри глобулы и появлением третичной структуры при сворачивании полипептидной цепи. Спектр поглощения в широкой области 200 - 600 нм, позволил выделить несколько максимумов (300-500 нм), принадлежащих хромофорам, которые окрашивают раствор белка.

Таблица 13. Характеристики ЛО

<i>Параметр</i>	<i>Свойства</i>
рН-оптимум	4,5-9,0
Структура (ПМР)	α -спиральные участки – 60 %; β -структурные участки – 40 %.
Термостабильность	20-50 °С – 100 % от начальной активности
	10 °С – 35 % от начальной активности
Хранение ЛО	5 сут (раствор ЛО при 37 °С) – 100 % сохранение активности 2 года в лиофилизованном состоянии (-18 °С) – 95-100% сохранение активности
<i>Факторы воздействия</i>	<i>Активность, % от начальной активности</i>
Проназа (2 мг/мл)	10 сут – 60 % от начальной активности
Химотрипсин (2 мг/мл)	10 сут – 70 % от начальной активности
Трипсин (2 мг/мл)	10 сут – 75 % от начальной активности
ДСН (3 %)	3 ч – 98 % от начальной активности
Твин 80 (3%)	3 ч – 100 % от начальной активности
Тритон Х-100 (3%)	3 ч – 97 % от начальной активности
Мочевина (6 - 8 М)	3 ч – 99 % от начальной активности
Гуанидинхлорид (1%)	1 ч – 30 % от начальной активности, (2 ч - 0%).

Следует добавить, что установленные выше характеристики ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, а именно: высокая стабильность, высокая селективность, высокая активность и высокое сродство к L-лизину, - обеспечивают эффективную «работу» фермента в окружающей среде.

3.6. Определение стерильности препарата ЛО

При определении стерильности необходимо установить возможное антимикробное действие препарата ЛО. Результаты этих исследований представлены ниже, в п. 3.8. Для устранения антимикробного действия в питательные среды были добавлены неспецифические инактиваторы: твина-80 и яичного лецитина, в концентрациях 30 и 3 г/л, соответственно.

Мониторинг стерильности субстанции ЛО с антимикробной активностью проводили согласно требованиям ГФ. Метод прямого посева на богатые среды роста (содержащие инактиваторы - Твин-80 и лецитин), показал отсутствие роста каких-либо микроорганизмов, что говорило о стерильности образцов ЛО.

В таблице 14 в сравнительном аспекте представлены биохимические свойства L-лизин- α -оксидаз, выделенных из различных грибов рода *Trichoderma*. Отличаются по некоторым характеристикам: рН или температурным оптимумам, а также кинетическим параметрам. Наиболее активный и стабильный фермент получен в настоящей работе при использовании в качестве продуцента гриб *T.cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

3.7. Лиофилизация фермента

Производство фермента в больших объёмах и разработка его лекарственной формы предполагает необходимость его лиофилизации. Известно, что после лиофилизации активность ферментов может значительно снижаться. Нами была проверена активность ЛО до и после лиофилизации. Результаты измерения показали потерю активности фермента, не превышающую 5% от исходной. Кроме того, измерение активности ЛО после 2-х лет хранения при -18 °С показало практически полное сохранение активности (до 95%). Полученные результаты показывают возможность гарантированного хранения фермента и его дальнейшей коммерциализации.

В таблице 14 в сравнительном аспекте представлены некоторые свойства ЛО из различных источников. Можно видеть, что ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D проявляет более высокую активность и сродство к лизину; рН оптимум, сопоставимый с таковыми, известными в литературе.

Полученные нами стандартные образцы фермента до и после лиофилизации были переданы в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина для доклинического изучения специфической противоопухолевой активности. В этих исследованиях был показан цитотоксический эффект ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F- 4268D *in vitro* на культурах тканей (лейкемия, рак кишечника, карцинома молочной железы, аденокарцинома яичников, карцинома простаты). Также был показан также терапевтический эффект *in vivo* на животных с перевитыми опухолями: карцинома молочной железы SKBR3, меланома Бро, рак кишечника HCT116 and LS174T, аденокарцинома яичников SCOV3, карцинома печени (Pokrovsky *et al.*, 2013, 2017).

Таблица 14. Физико-химические свойства ЛО из грибов рода *Trichoderma*

Параметры	<i>T. cf. aureoviride</i> Rifai ВКМ F-4268D	<i>T. viride</i> (Kusakabe <i>et al.</i> , 1979)	<i>T.harzianum</i> Rifai (Смирнова и др 2009)	<i>T. pseudokonigii</i> (Hu <i>et al.</i> ,1994)	Рекомбинантная из <i>T. viride</i> (Amano <i>et al.</i> ,2015)
Молекулярная масса димера, кДа	115-116	116	120	116	116
рН оптимум	4,5 -9,0	7,4-9,2	7,8 – 8,2	5,0-9,0	н.д.
Температурный оптимум, °С	37-40	37	37	50	50
К _М для лизина, μМ	1,015	40	14,0 ± 0,002	27	н.д.
S_{0,5} , мкМ	17.1 ± 0,7	н.д.	н.д.	н/д	н.д.
Активность, мкмоль/мин мкг белка	4,196 ± 0,14	н.д.	н.д.	н/д	н.д.
Активность, Е/мг белка	100	66	40	61	80

н.д. - нет данных

3.8. Функциональная роль ЛО

Грибы рода *Trichoderma* синтезируют множество низкомолекулярных, так называемых вторичных метаболитов с антибиотическими свойствами, способных подавлять прорастание спор, рост и развитие фитопатогенов. Эти грибы также активно синтезируют литические ферменты, разрушающие клеточные стенки грибов и бактерий. Обработка растений препаратами *Trichoderma* сопровождается развитием у растений системной устойчивости к патогенам и различным стрессам. Этот процесс изучен недостаточно, поскольку достоверно не установлены элиситоры или метаболиты, индуцирующие развитие системной устойчивости у растений.

Известно, что некоторые штаммы грибов *Trichoderma* синтезируют внеклеточную ЛО (Kusakabe *et al.*, 1979; Березов и др. 1987), и этот фермент является предметом интенсивного изучения в связи с его высокими потенциалом применения в биотехнологии и медицине. Но факт биосинтеза внеклеточной ЛО грибами *Trichoderma* остается за рамками изучения ее функциональной роли в природном окружении, в том числе как часть одного из механизмов, контролирующей численность фитопатогенов.

3.8.1. Антагонистическое действие ЛО

С целью охарактеризовать вероятную функциональную роль для продуцента в природных условиях нами изучено также антагонистическое действие фермента. Кроме того, выявление антимикробного действия необходимо в качестве обязательного этапа проверки образцов потенциальных лекарственных препаратов на стерильность (Согласно требованиям Государственной Фармакопеи РФ). В этих исследованиях использовали тест-микроорганизмы и среды для их культивирования, рекомендованные ФС для определения антимикробного действия медицинских препаратов.

Показано, что рост всех тестируемых аэробных микроорганизмов на жидкой среде полностью подавлялся препаратом ЛО (таблица 15). Антимикробный эффект ЛО проявлялся как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, а также грибов, включая фитопатогены.

Рост анаэробной бактерии *Clostridium sporogenes* ГИСК 272 от присутствия ЛО не зависел.

Следует отметить, что антимикробное действие ЛО было устранено путем добавления в жидкие питательные среды неспецифических инактиваторов: твина-80 и яичного лецитина. В этом случае рост аэробных бактерий, а также грибов в присутствии ЛО, был сопоставим с контрольным вариантом (без ЛО). При этом следует учитывать, что,

в присутствии твина-80 наблюдалось 100%-ное сохранение активности ЛО, как было показано в п. 3.5.15 (таблица 13).

Таблица 15. Антимикробное действие субстанции ЛО на тест-микроорганизмы

Питательные среды	Тест-микроорганизмы	Рост культуры
Жидкая среда 5/5	<i>B. subtilis</i> ВКМ В 720	+
	<i>B. subtilis</i> ВКМ В 720 +ЛО	–
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	+
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P+ЛО	–
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	+
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027+ЛО	–
	<i>E. durans</i> ВКМ В-603	+
	<i>E. durans</i> ВКМ В-603 +ЛО	–
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 + ЛО	–
Жидкая тиогликолевая среда	<i>C. sporogenes</i> ГИСК 272	+
	<i>C. sporogenes</i> ГИСК 272 +ЛО	+
Жидкая соево-казеиновая среда	<i>F. decemcellulare</i> ВКМ F-1179	+
	<i>F. decemcellulare</i> ВКМ F-1179 +ЛО	–
	<i>A. niger</i> ATCC 9642	+
	<i>A. niger</i> ATCC 9642 + ЛО	–
Жидкая среда Сабуро	<i>A. niger</i> ATCC 9642	+
	<i>A. niger</i> ATCC 9642 +ЛО	–
	<i>R. solani</i> ВКМ F-895	+
	<i>R. solani</i> ВКМ F-895+ ЛО	–
Жидкая среда Ридер	<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-2378	+
	<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-2378+ ЛО	–

Условия инкубации: $32,5 \pm 2,5$ °C, время инкубации 3 сут.

На рис. 27 показано ингибирование роста грамположительных бактерий *E. durans* ВКМ В-603 (каталазоотрицательная) и *B. subtilis* ВКМ В 720 (каталазоположительная) под действием ЛО в различной концентрации.

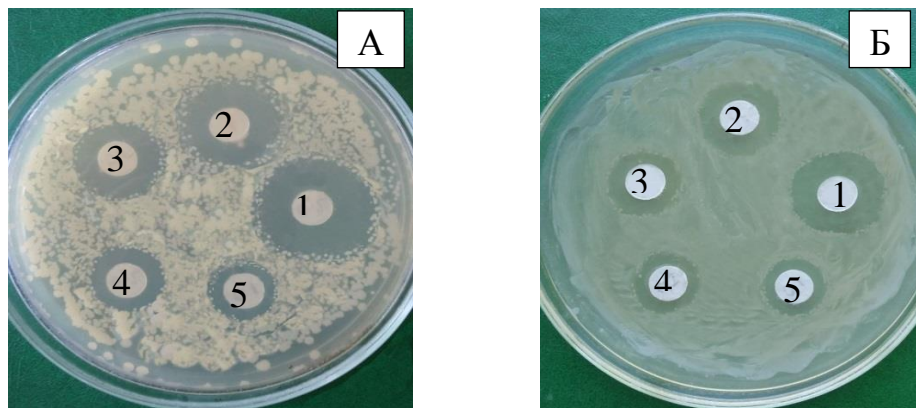


Рис. 27. Влияние ЛО в различной концентрации на рост бактерий *E. durans* ВКМ В-603 (А) и *B. subtilis* ВКМ В 720 (Б). 1- 5 Е/мл; 2- 1 Е/мл; 3- 0,5 Е/мл; 4-0,2 Е/мл; 5- 0,1 Е/мл.

Известно (Skarnes, 1970; Lucas-Elio *et al.*, 2006), что пептиды и белки, синтезируемые многими микроорганизмами, проявляют антимикробную активность. Так, антимикробное действие показано и для оксидаз L-аминокислот из различных источников: животных клеток (Puiffe *et al.*, 2013; Hanane-Fadila and Fatima, 2014), грибов (Yang *et al.*, 2011) и бактерий (Lucas-Elio *et al.*, 2006). При этом обнаружено, что действующим началом могут являться не сами оксидазы, а пероксид водорода, который образуется при расщеплении соответствующего субстрата, тем самым, обеспечивая условия окислительного стресса (Lucas-Elio *et al.*, 2006). Не исключено, что аналогичный механизм может также определять и антимикробное действие ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

Однако существуют и другие механизмы антимикробного действия оксидаз аминокислот, не связанные непосредственно с образованием активных форм кислорода в окружающей среде, а обусловленные взаимодействием оксидаз с клеточной стенкой и последующей программируемой гибелью клетки (Yang *et al.*, 2011, 2012). Такой эффект был показано для фенилаланин оксидазы из *T.harzianum* против фитопатогенных грибов *R. solani* ВКМ F-895 (Yang *et al.*, 2011, 2012).

Для выяснения вопроса о возможном механизме действия ЛО на микроорганизмы, исследовали антимикробное действие ЛО в присутствии и отсутствии каталазы при культивировании тестовых микроорганизмов на агаризованной питательной среде.

На рис. 28 А, Б, В, Г-1 показано, что во всех случаях в присутствии ЛО, образовывались зоны лизиса, свидетельствующие о гибели клеток.

При добавлении лизина зона лизиса на газоне каталазоотрицательной бактерии *E. durans* ВКМ В-603 увеличивалась в 4 раза (рис. 28 А-2). Последующее добавление каталазы (рис. 28 А-3) приводило к уменьшению ингибирования роста микроорганизма (уменьшение зоны лизиса).

В случае каталазоположительных микроорганизмов: *P. aureofaciens* ВКМ В-1249, *S. aureus*, или *E. coli*, соответствующие эффекты при добавлении лизина и каталазы также имели место, но были менее ярко выражены (рис. 28 Б, В, Г-3).

Следует особо отметить, что во всех указанных случаях добавление каталазы не снимало полностью антимикробного эффекта ЛО.

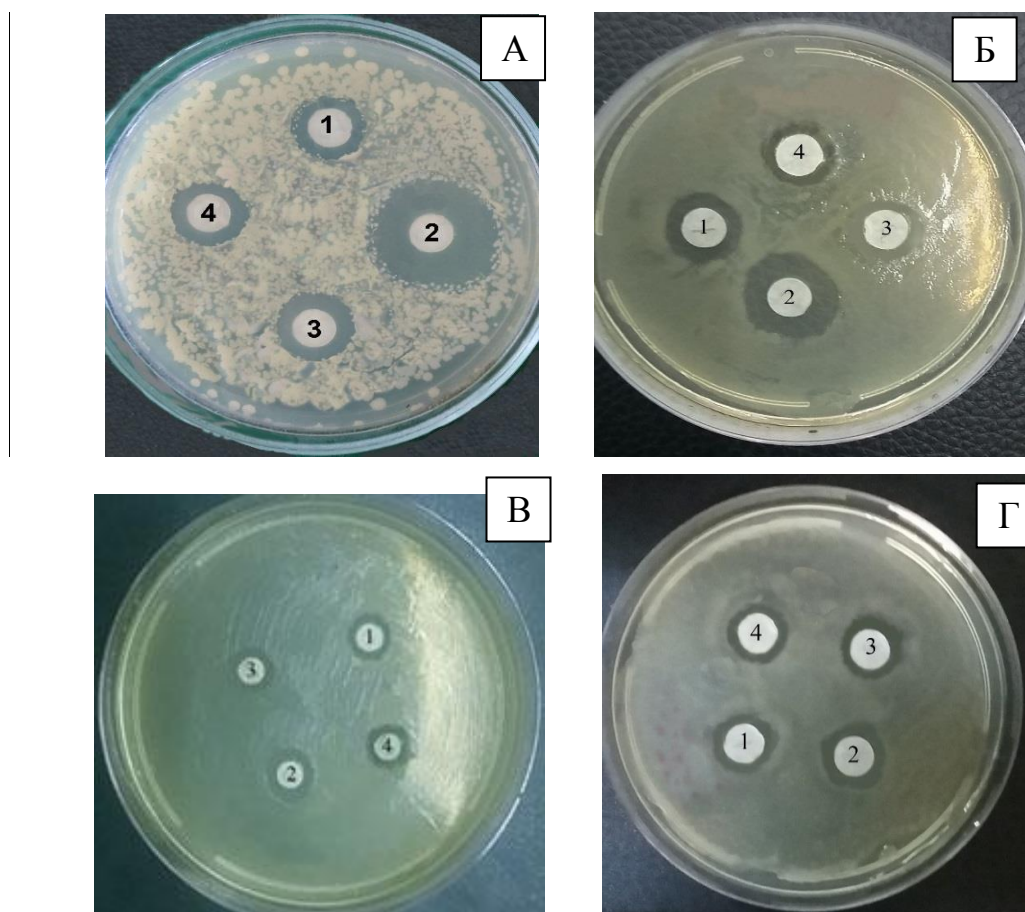


Рис. 28. Выявление антимикробной активности ЛО (1Е) на культуре: А – *E. durans* ВКМ В-603, Б – *P. aureofaciens* ВКМ В-1249, В– *E. coli* АТСС 25922, Г- *S. aureus* АТСС 6538-Р.

1 – ЛО (1 Е); 2 – ЛО (1 Е) + L-лизин (10 мкМ); 3- ЛО (1 Е) + L –лизин (10 мкМ) + каталаза (10 мкг); 4 – ЛО (1 Е) + каталаза (10 мкМ).

Полученные результаты позволяют дифференцировать антимикробное действие ЛО, основанное на 1) образовании экзогенного пероксида водорода в результате каталитической реакции и 2) непосредственном взаимодействии ЛО с клеточной стенкой

микроорганизма. При этом необходимо учитывать представленные выше результаты изучения субстратной специфичности, а именно: проявление активности ЛО с лизином или дипаминопимелиновой кислотой, которые являются компонентам пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерий.

В любом случае могут иметь место нарушение различных функции клеточной стенки (процессы поляризации, транспорта различных метаболитов и др.) и запуск процессов, подобных апоптозу, что и лежит в основе бактериостатического или бактерицидного эффектов.

Для дальнейшего выяснения механизма антимикробного действия было изучено изменение внутриклеточного содержания активных форм кислорода (АФК) в присутствии ЛО.

На рис. 29 и 30 представлены результаты, демонстрирующие накопление АФК внутри клеток бактерий *S. aureus* ATCC 6538 и фитопатогенных грибов *R. solani* ВКМ F-895. Можно видеть, что присутствие ЛО в различной концентрации приводило к увеличению флуоресценции дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата в соответствии с увеличением внутриклеточной концентрации АФК. При этом происходила гибель клеток: при инкубации с ЛО в концентрации, равной 10 мкг/мл, доля мертвых клеток *S. aureus* ATCC 6538 достигала 90%-100% через 18 ч (табл. 16); *R. solani* ВКМ F-895 - через 48 ч (табл. 17).

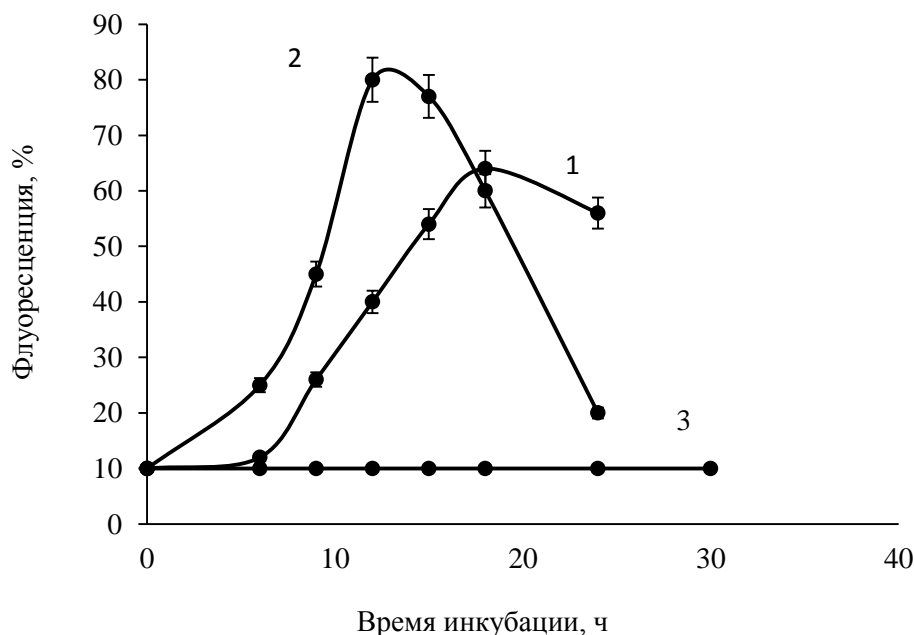


Рис. 29. Образование АФК у бактерий *S. aureus* ATCC 6538 в присутствии ЛО. 1-5 мкг/мл, 2 - 10 мкг/мл, 3- 0 мкг/мл (контроль).

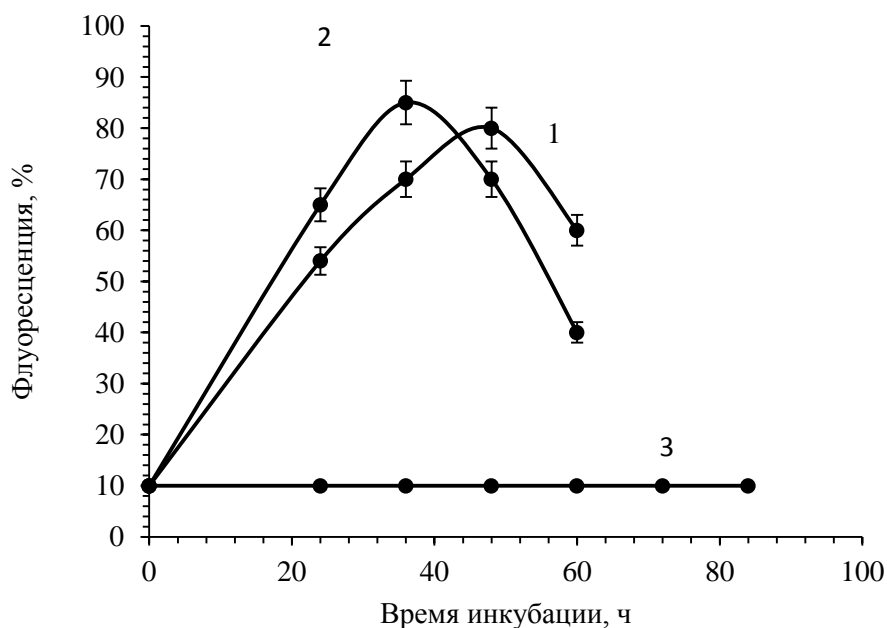


Рис.30. Образование АФК у грибов *R. solani* ВКМ F-895 в присутствии ЛО. 1-5 мкг/мл, 2- 10мкг/мл, 3-0 мкг/мл (контроль).

Таблица 16. Количество жизнеспособных клеток бактерий *S. aureus* ATCC 6538 при инкубации в присутствии ЛО

Время инкубации, ч	Контроль	ЛО, 5 мкг/мл	ЛО, 10 мкг/мл
0	100%	100%	100%
6	100%	90%	80%
9	100%	80%	60%
12	100%	60%	40%
15	100%	40%	20%
18	100%	10%	1%
21	100%	1%	0%
24	100%	0%	0%

Аналогичный эффект был показан для фенилаланин-оксидазы из *T. harzianum*, ингибирующей роста гриба *R. solani* ВКМ F-895, что сопряжено с митохондриальной дисфункцией (выходом цитохрома *c*) и апоптозом (Yang *et al.*, 2011, 2012).

Увеличение содержания внутриклеточного уровня АФК был также показан как один из механизмов цитотоксического действия ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D на модели клеточной линии феохромоцитомы крысы РС-12 (Лукашева и др., 2015).

Накопление АФК в бактериях и грибах, обработанных ЛО, наряду с образованием экзогенного H_2O_2 может приводить к перекисному окислению липидов (Mutoh *et al.*, 1995), повреждению и разрыву цепи ДНК (Dalton *at al.*, 1999), что также может приводить к ингибированию роста микроорганизмов.

Таблица 17. Количество жизнеспособных клеток грибов *R. solani* ВКМ F-895 при инкубации в присутствии ЛО

Время инкубации, ч	Контроль	ЛО, 5 мкг/мл	ЛО, 10 мкг/мл
0	100%	100%	100%
24	100%	80%	50%
36	100%	40%	25%
48	100%	5%	1%
60	100%	0%	0%

Таким образом, в основе антимикробного эффекта ЛО лежит, во-первых, образование пероксида водорода, образующегося в процессе окислительного дезаминирования L-лизина. Во-вторых, антагонистическая активность может быть обусловлена взаимодействием ЛО с компонентами клеточной стенки и накоплением внутриклеточных АФК.

Представленные данные позволяют полагать, что ЛО наряду с другими внеклеточными белками, протеазами и антимикробными пептидами (Аринбасарова и др., 2017) выполняет защитные функции для продуцента и обеспечивает адаптивное преимущество в конкуренции с другими организмами, бактериями и грибами.

Среди микроорганизмов, рост которых подавлялся ЛО, были указаны *B. subtilis* (рис. 27 Б) и *P. aureofaciens* (рис. 28 Б). Известно, что некоторые виды *Bacillus* и *Pseudomonas* благоприятно воздействуют на растения и почву и эффективно применяются в сельском хозяйстве для повышения иммунитета растений, защиты их от различных болезней и улучшения почвы, что, в свою очередь, способствует увеличению урожайности (Stockwell and Stack, 2007; Березина и др 2008).

Данные об антагонистическом действии ЛО необходимо учитывать при выборе штаммов для создания биопрепаратов. Кроме того, способность к подавлению почвенной микрофлоры и ростстимулирующая активность препаратов на основе грибов или бактерий зависит от типа почвы, гидротермических факторов, состава микробиоты, сортовых

особенностей культур, а также экологической ниши, в которой будут функционировать микроорганизмы (Садыкова и др., 2013, 2015).

С другой стороны, созданы комбинированные препараты, в том числе, например, пробиотик почвы ГЛОБИОМА Биота Макс (Украина), на основе 6 видов бактерий (*B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilis*, *P. polymyxa*) и 4 видов грибов рода *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. polysporum*). Все компоненты в совокупности способствуют восстановлению почвы и благоприятно воздействуют на растения, ускоряя их рост и увеличивая урожайность.

3.8.2. Определение некоторых метаболитов в среде роста гриба в условиях синтеза ЛО

Микроорганизмы постоянно «контролируют» свое окружение в природных условиях. Сбор и анализ экзометаболитов (в динамике) позволяют определить наиболее вероятные функции клетки в регулировании природной окружающей среды.

На рис. 31 представлены результаты измерения концентрации пероксида водорода в среде культивирования гриба в присутствии NH_4Cl и без него. Отмечено, что в присутствии NH_4Cl (4%), пероксид водорода обнаруживался в среде на 2-3 сут роста гриба, что совпадает по времени с началом биосинтеза ЛО. Максимальная концентрация отмечалась на 6-7 сут роста. В отсутствие NH_4Cl , пероксид водорода, как и ЛО в среде роста гриба, практически не выявлялся. Полученные результаты позволяют предполагать некую зависимость между наличием активности ЛО и образованием пероксида водорода в среде роста гриба.

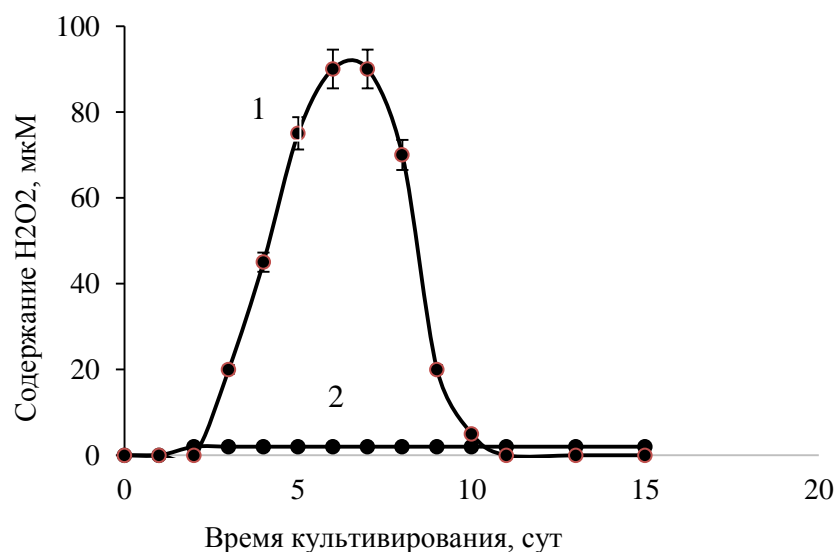


Рис. 31. Содержание H_2O_2 в среде культивирования *T. cf. aureoviride* Rifai BKM F-4268D в присутствии (1) и в отсутствие (2) NH_4Cl

Из литературных данных известно, что грибы рода *Trichoderma* вырабатывают целый комплекс экзогенных ферментов способных разлагать множество природных субстратов. Также отмечено, что значение pH среды на 3-4 сут культивирования падает до 4,5-5,0, что соответствует оптимуму работы протеолитических ферментов, выделяемых *Trichoderma* (Алимова и др., 2007).

Нами была изучена активность внеклеточных протеолитических ферментов *Trichoderma*, гидролизующих белковые компоненты пшеничных отрубей, обеспечивающих наличие в среде роста аминокислот, в том числе и лизина. На рис. 32 показано, что в присутствии NH_4Cl протеолитическая активность проявлялась на 2-е сут роста гриба и достигала максимального значения на 5-7 сут.

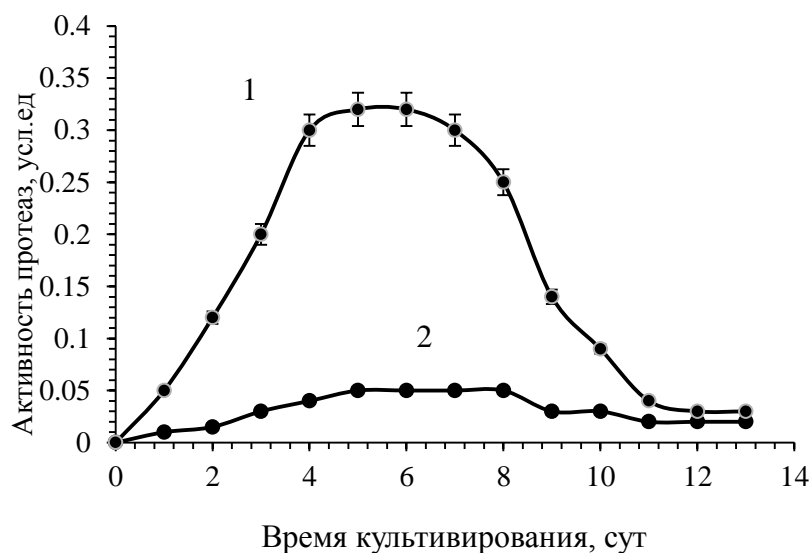


Рис. 32. Активность протеолитических ферментов при культивировании *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D в присутствии NH_4Cl (1) и в отсутствие соли (2).

Активность протеолитических ферментов при росте гриба в присутствии NH_4Cl (рис. 32, кривая 1) заметно превышала таковую в отсутствие NH_4Cl в среде (рис. 32, кривая 2). Следует отметить, что динамика протеолитической активности (рис. 32) коррелирует с динамикой накопления пероксида водорода в среде роста гриба (рис. 31).

Также был проведен анализ аминокислотного состава среды роста при культивировании гриба. В таблице 18 представлены результаты анализа содержания аминокислот в среде культивирования гриба, синтезирующего ЛО.

После 1 сут в среде культивирования обнаружено более 10 аминокислот. Можно отметить определенную динамику содержания этих метаболитов в ростовой среде. Содержание некоторых из них (аспарагин, аланин, треонин, серин) достигало

максимального значения на 3-5 сут, после чего аминокислоты активно потреблялись в процессе дальнейшего роста гриба; другие (глутамин) - постепенно накапливались в среде, и к концу культивирования их концентрация достигала 33,8 мг/л. Следует отметить, что L-лизин обнаруживался только на 1-2 сут роста. Отсутствие лизина после первых сут культивирования, вероятно, можно объяснить тем, что освобождающийся лизин интенсивно окисляется внеклеточной ЛО с образованием пероксида водорода.

Таблица 18. Содержание аминокислот в среде роста гриба *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268Dв процессе синтеза ЛО

Время роста, сут	Аминокислоты, мг/л						
	Лизин	Аспарагин	Треонин + серин	Глутамин	Глицин	Аланин	Валин
0	следы	следы	следы	следы	следы	следы	следы
1	11,9	9,24	8,3	10,15	4,4	5,7	3,7
2	7,8	11,8	8,5	11,8	5,3	8,3	6,23
3	0	10,73	20,9	13,2	5,15	18,96	7,2
4	0	9,64	19,58	18,4	3,5	11,2	7,7
5	0	9,56	17,7	23,7	3,1	10,42	7,3
6	0	8,59	12,58	26,1	2,5	8,52	следы
7	0	6,2	8,2	27,1	2,1	7,3	нет
9	0	2,7	6,6	29,3	1,8	5,1	нет
10	0	2,8	3,5	+33,8	1,68	3,79	нет

Примечание: рост в погруженной культуре на пшеничных отрубях в присутствии NH_4Cl

Образование H_2O_2 и протеазной активности было также показано на субстратах из других злаковых культур. На рис. 33 в качестве примера представлена динамика накопления в среде ЛО, пероксида водорода, а также протеолитическая активность при росте измельченных семян мятлика лугового.

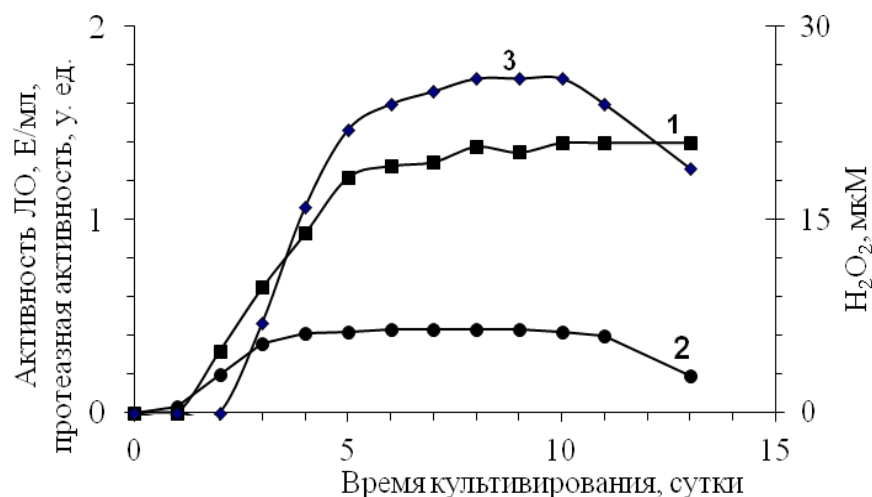


Рис. 33. Динамика накопления ЛО (1), протеолитической активности (2) и H₂O₂ (3) в среде культивирования *T. cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D на семенах мятлика лугового.

Наряду с различными аминокислотами, протеазами и H₂O₂ в ферментационной среде методом масс-спектрометрии обнаружена пипеколиновая кислота (в концентрации до 20 мкМ) (рис. 34), образующаяся, вероятно, из 2-кето-6-аминокапроата – другого продукта окислительного дезаминирования L-лизина (рис. 35). Образование пипеколиновой кислоты отмечалось при росте гриба на средах, содержащих не только пшеничные отруби, но и субстраты из других злаковых культур.

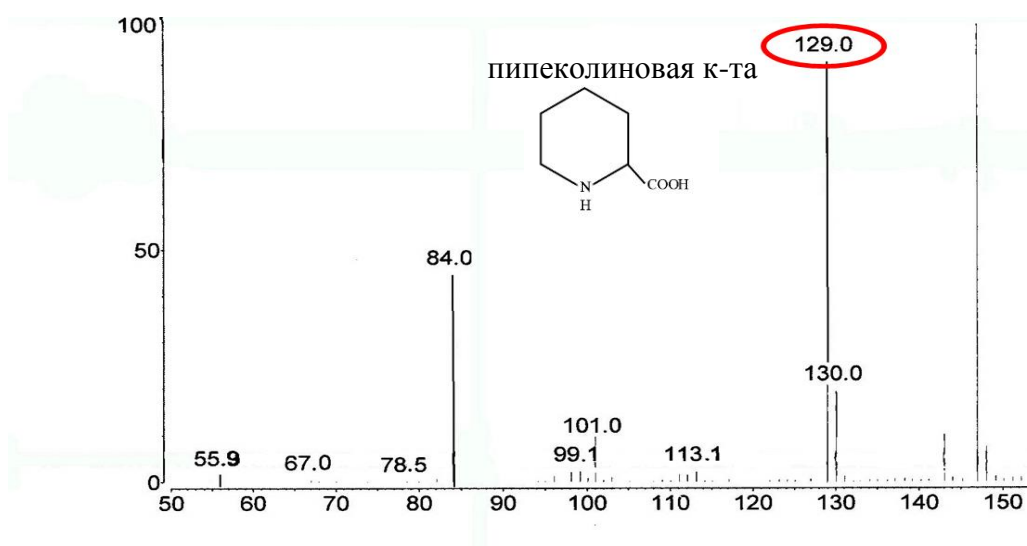


Рис. 34. Масс-спектрометрический анализ метаболита (пипеколиновой кислоты) в среде роста гриба *Trichoderma*. Рост в погруженной культуре на пшеничных отрубях в присутствии NH₄Cl.

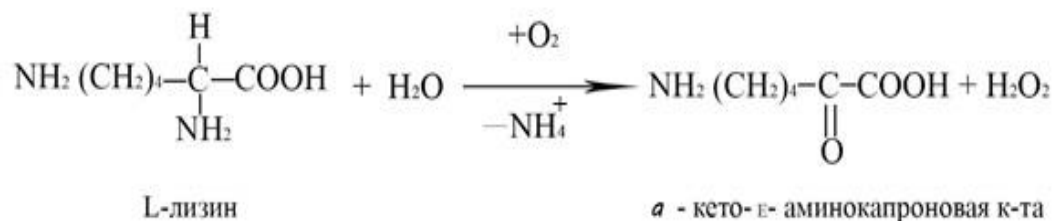


Рис. 35. Окислительное дезаминирование L-лизина ферментом ЛО (Лукашева и др., 2002).

Следует особо отметить, что пипеколиновая кислота обнаруживалась в ростовой среде гриба только в условиях биосинтеза ЛО (на различных злаковых), при этом α -кето- ϵ -аминокапроновая кислота не была обнаружена. Образование этого соединения отмечалось в модельных опытах (в буфере) при непосредственном взаимодействии ЛО с лизином, что также показано с помощью масс-спектрометрии (рис. 35).

Полученные результаты позволяют представить следующую цепь событий в процессе погруженного культивирования гриба на пшеничных отрубях. В стрессовых условиях у гриба индуцируется синтез внеклеточных ЛО и протеолитических ферментов. Освобождающийся в результате действия протеаз L-лизин окисляется ЛО с образованием перекиси водорода и пипеколиновой кислоты, которые накапливаются в среде культивирования.

Ранее было показано (Návarová *et al.*, 2012; Vogel-Adghoughet *et al.*, 2013; Bernsdorff *et al.*, 2015), что активные формы кислорода и пипеколиновая кислота играют центральные роли в индукции и развитии системной устойчивости растений. Пипеколиновая кислота индуцирует синтез растительных гормонов – жасминовой и салициловой кислот, ответственных за устойчивость растения к некротрофам и биотрофам.

Пероксид водорода (и другие активные формы кислорода) является ключевым элементом в активации митоген-активируемых протеиназ, также участвующих в иммунном ответе растений при биотических и абиотических стрессах (Bernsdorff *et al.*, 2015).

Кроме того, известно, что пероксид водорода индуцирует образование фенилаланин-аммоний-лиазы, синтезирующей салициловую кислоту из фенилаланина, которая, в свою очередь, тоже является сигнальной молекулой для активации защитных механизмов (Pitzschke *et al.*, 2009; Vogel-Adghough *et al.*, 2013).

Таким образом, можно предполагать, что образующиеся пероксид водорода и пипеколиновая кислота определяют возможную функциональную роль внеклеточной ЛО как участие в индуцировании системной устойчивости растений в развитии иммунного ответа растений на инвазию патогена.

На рис. 36 представлено предполагаемое участие ЛО во взаимоотношениях "Растение - *Trichoderma* - Патоген" в природных условиях. Очевидно, что пероксид водорода и пипеколиновая кислота определяют возможную функциональную роль внеклеточного фермента в индуцировании системной устойчивости растений.

Представленные данные дополняют представление о механизмах развития системной устойчивости растений при использовании грибов рода *Trichoderma* в качестве агентов биоконтроля.

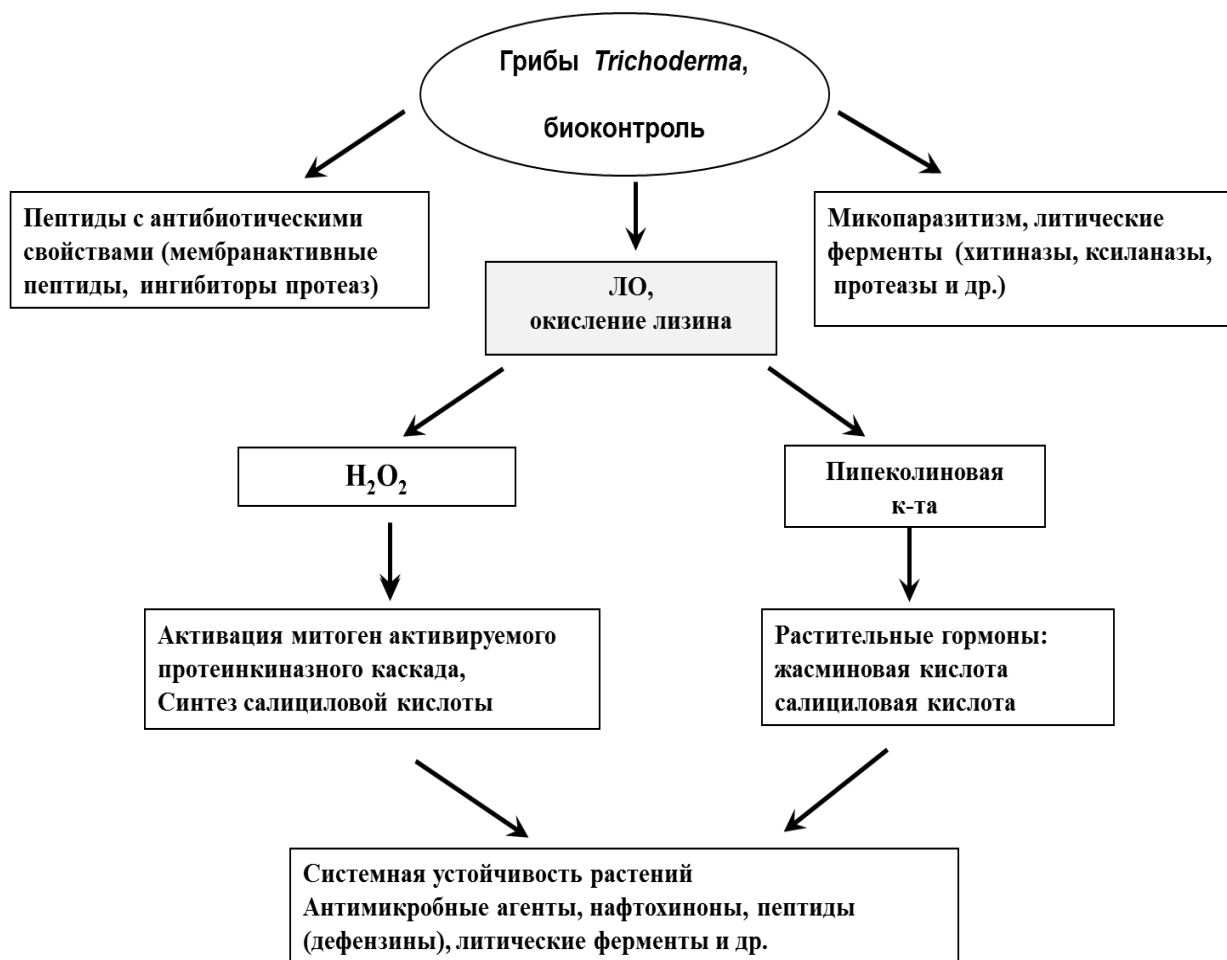


Рис. 36. Предполагаемое участие *Trichoderma* и ЛО в индуцировании системной устойчивости растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием найденного активного штамма-продуцента *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D создан и отработан эффективный процесс биосинтеза ЛО на лабораторном уровне. Создана эффективная схема получения фермента, включающая метод очистки фермента, основанный на осаждении его с помощью комплексных солей меди и позволяющий получать гомогенный препарат ЛО с высокой удельной активностью – 100 Е/мг белка (степень очистки 250 раз). На основе полученных данных разработан лабораторный регламент получения L-лизин- α -оксидазы.

Впервые показано, что ЛО синтезируется грибами рода *Trichoderma* при росте на субстратах из семян различных злаковых культур. Процесс биосинтеза ЛО грибом *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D сопровождается накоплением в ростовой среде не только внеклеточных протеолитических ферментов, гидролизующих белковые компоненты пшеничных отрубей и обеспечивающих поступление в среду роста аминокислот, а также H_2O_2 и пипеколиновой кислоты – элиситоров системной устойчивости растений.

Показано, что ЛО является высокоактивным стереоспецифичным ферментом с широким рН оптимумом (рН 4,0-8,9), стабильным при хранении, устойчивым к действию детергентов, мочевины, протеаз и температуры. Изучение кинетических характеристик, проведенное с учетом аллостерических эффектов ($h = 2,03$), позволило выявить высокое сродство ЛО к лизину ($K_m \approx 10^{-5}$ М). Указанные характеристики ЛО из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D демонстрируют высокий потенциал фермента в окружающей среде.

Установленные антимикробные и ферментативные свойства, а также образование пипеколиновой кислоты и H_2O_2 определяют функциональную роль внеклеточной ЛО. С одной стороны, ЛО выполняет защитные функции для продуцента и обеспечивает ему адаптивное преимущество в конкуренции с другими организмами. С другой стороны, ЛО может опосредованно участвовать в индуцировании системной устойчивости растений и регулировании взаимоотношений “*Trichoderma* – растение – патоген”. В эволюционном аспекте системная устойчивость базируется на нескольких стратегиях, которые значительно различаются от вида к виду. Маловероятно, что существует единый ключ регуляции, ЛО – лишь один из механизмов.

Указанная биологическая активность наряду с физико-химическими свойствами, включая кинетические характеристики, позволяют рассматривать ЛО в качестве перспективного противоопухолевого средства в терапии онкологических заболеваний. Полученные по разработанной схеме стандартные образцы гомогенного фермента из *T. cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D проходят испытания в ГОУ РОНЦ.

Рассматривая перспективы использования ЛО в других областях, следует указать возможное использование фермента для создания биосенсоров, а также для разработки лекарственных средств против бактерий, резистентных к антибиотикам.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга найден активный штамм-продуцент ЛО, выделенный из образцов лесной почвы (г. Пущино, Московская область), идентифицированный как *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.
2. Впервые показано, что синтез ЛО происходит в процессе роста грибов рода *Trichoderma* на субстратах из семян различных злаковых растений.
3. Подобраны оптимальные условия биосинтеза ЛО: тип культивирования (погруженное), субстрат (пшеничные отруби), рН ($\leq 6,0$), рО₂ (70 – 80%), температурный режим (37 °С → 1 – 5 сут), 24 °С → 6 – 12 сут роста).
4. Предложены 2 высокоэффективных метода выделения ЛО:
 - А) отработан метод, основанный на осаждении (NH₄)₂SO₄ с последующими гидрофобной и ионообменной хроматографиями.
 - Б) разработан новый метод, основанный на осаждении фермента комплексными солями Cu²⁺, также с последующей гидрофобной и ионообменной хроматографией. Получен гомогенный препарат с высокой удельной активностью (100 Е/мг белка), позволяющий его использование в медицинских исследованиях.
5. Определены ферментативные свойства ЛО:
 - Установлены молекулярная масса ЛО, количество и масса субъединиц, кофермент (ФАД), оптимумы рН и температуры.
 - Впервые определены кинетические характеристики фермента с учетом аллостерических эффектов: оценены коэффициент Хилла ($h = 2,03 \pm 0,14$) и K_m ($1,015 \cdot 10^{-5}$ М). Показаны высокие селективность и стереоспецифичность.
 - Впервые определена термодинамическая характеристика ЛО - энергия активации (2,61 ккал/моль).
 - Показана высокая стабильность фермента: устойчивость при хранении, к действию детергентов (ДСН), мочевины, протеаз и температуры.
6. Впервые выявлены факторы, предопределяющие функциональную роль ЛО: показано, что процесс синтеза ЛО грибом *Trichoderma* сопровождается накоплением в ростовой среде пипеколиновой кислоты и Н₂О₂ - элиситоров системной устойчивости растений.

7. Впервые определен механизм антимикробного действия фермента ЛО как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами. Показано, что действие ЛО обусловлено образованием экзогенного пероксида водорода, а также внутриклеточных АФК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- D-ОАК – оксидазы D-аминокислот
L-ОАК – оксидазы L-аминокислот
АДФ – аденозиндифосфат
АМФ – аденозинмонофосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активные формы кислорода
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ – Государственная Фармакопея
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН– додецилсульфат натрия
КД – константа диссоциации
К. Ж. – культуральная жидкость
ЛО – L-лизин-альфа-оксидаза
МАО – моноамиоксидаза
М. м. – молекулярная масса
ПААГ – полиакриламидный гель
ПАО – полиаминооксидаза
ПМР – протонно-магнитный резонанс
РНК – рибонуклеиновая кислота
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ФМН – флавинмононуклеотид
ФНО – фактор некроза опухолей
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова А.В. Род *Trichoderma* Pers.: Fr. В кн.: Новое в систематике и номенклатуре грибов. – М.: Национальная академия микологии, Медицина для всех. – 2003. – С. 219-275.
2. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. – Казань: Унипресс ДАС, – 2006. – 268с.
3. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. / Ф.К. Алимова, В.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбанова – Казань: Изд-во Казанского государственного университета им. В.И. Ленина. – 2007. – 229с.
4. Алимова Ф. К. Использование *Trichoderma* в процессе переработки отходов спиртового производства / Ф.К. Алимова, Е.В. Скворцов, Т.А. Мельникова, Р.И. Тухбанова, Д.И. Тазетдинова // Вестник биотехнологии. – 2007. – № 3. – С. 22-26.
5. Аринбасарова А.Ю., Низкомолекулярный антимикробный пептид *Trichoderma* cf. *Aureoviride* Rifai ВКМФ-4268D / А.Ю. Аринбасарова, Б.П. Баскунов, А.Г. Меденцев // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 2. – С. 9-12.
6. Березина Н.В. Механизмы действия микробиологических препаратов "Алирин-Б" и "Гамаир" / Н.В. Березина, Т.А. Костенко // Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология ООО "ЭМ-Кооперация". Москва, – 2008. – С. 248-250
7. Березов Т.Т. К вопросу об определении активности оксидаз L-аминокислот / Т.Т. Березов, Е.В. Лукашева, Е.П. Смирнова // Вопросы мед. химии. – 1987. – № 1.1. – С.127-132.
8. Березов Т.Т. Молекулярные и биохимические основы энзимотерапии опухолей / Т.Т. Березов // Биомедицинская химия. –2005. –Т. 51. – №. 3. – С. 235-247.
9. Винокурова Т.П. Триходермин против болезней в защищенном грунте / Т.П. Винокурова // Защита растений. – 1991. – №1. – С. 9-10.
10. Горленко М.В. Все о грибах. / Горленко М.В. Гарибова Л.В., Сидорова И.М., Сизова Г. Л., Успенская Г. Д. – М.: Изд-во Лесная промышленность. –1985. – С .280.
11. Гринько Н.Н. Биотехнологические аспекты культивирования штамма *Trichoderma harzianum*. Rifai ВКМ Б-2477Д / Н.Н. Гринько // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2004. – №1. – С. 57-61.
12. Громовых Т.И. Фитопатогенные микромицеты семян хвойных в Средней Сибири: видовой состав, экология, биологический контроль: автореф. диссертации. доктора биологических наук: 03. 00. 24 / Громовых, Татьяна Ильинична. – Москва, – 2002. – 362с.

13. Жуковский А.П., Термостабильность структуры белков в нативном состоянии и механизм ее поддержания / А.П. Жуковский, А.И. Халоимов, Н.В. Ровнов, А.Н. Раев // Биофизика. – 1987. Т. 32. – С. 583-587.
14. Зайчик А. Ш. Общая патофизиология (с основами иммунопатологии) / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов, В.И. Утехин – СПб: Изд-во ЭЛБИ- СПб. 2003. – 380 с.
15. Лугаускас А.Ю. Почвенные грибы в микробных сообществах в разных экологических условиях / А.Ю. Лугаускас – Киев: Наукова думка. 1981. – С.187-191.
16. Лукашева Е.В. Каталитические свойства L-лизин-а-оксидазы из *Trichoderma sp* / Е. В. Лукашева, Т. Т. Березов // Прик. биохимия и микробиол. –1988. – Т. 24. – №. 4. – С. 459-465.
17. Лукашева Е.В., Сравнительное физико-химическое изучение L-лизин-а-оксидазы при поверхностном и глубинном способе культивирования *Trichoderma sp* / Е.В. Лукашева, В.С. Веса, Т.Т. Березов // Вопросы мед. химии. – 1993. – Т. 39. – №1.1. – С. 45-47.
18. Лукашева Е.В. L-Лизин-а-оксидаза: физико-химические и биологические свойства / Е.В. Лукашева, Т.Т. Березов // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – №. 8. – С.1394-1401.
19. Лукашева, Е. В. Оксидазы L-аминокислот: свойства и молекулярные механизмы биологического действия / Е.В. Лукашева, А.А. Ефремова, Е.М. Трещалина, А.Ю. Аринбасарова, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов, // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58. – №. 4. – С. 372-384.
20. Лукашева Е.В. Перспективы поиска новых ферментов с противоопухолевым действием / Е.В. Лукашева, З.И. Лебедева, А.Х. Керимова, Е.М. Трещалина, Л.А. Седакова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. –2006. –№ 2. – С. 42-46.
21. Лукашева, Е.В. Влияние L-лизин-альфа-оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D на клетки культуры феохромоцитомы крысы РС12 / Е.В. Лукашева, Ю.С. Рыбакова, Т.Н. Федорова, М.Г. Маклецова, А.Ю. Аринбасарова, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – №. 1. – С. 99-104.
22. Новикова И.И. Влияние новых биопрепаратов, созданных на основе штаммов микробов-антагонистов, на комплекс возбудителей корневых гнилей огурца / И.И. Новикова, А.И. Литвиненко, Г.В. Калько // Микол. и фитопатол. –1995. – № 5-6. – С. 46-53.
23. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1985. – С. 109-124.
24. Папоян А. Р. Исследование активностей каталазы и оксидаз D-, L-аминокислот у *Aspergillus niger* R-3 / А.Р. Папоян, С.П. Оганесян, А.С. Мовсесян, Г.А. Габриелян, М. А. Давтян // Биологический журнал Армении. –2002. – Т. 54. – №. 1-2. – С. 166-167.

25. Пат. № 1044043 СССР. МКИ C12N 15/00. Штамм *Trichoderma harzianum* Rifai продуцент L-лизин- α -оксидазы / И.П. Смирнова, Т.Т. Березов, Л.Н. Чекунова; заявитель и патентообладатель: Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы. – № 3425640/13; заявл. 21.04.1982.

26. Пат. № 2022012 Российская Федерация, МПК⁷ C12N9/00. Ингибитор вируса герпеса простого I типа / Березов Т.Т., Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Згурский А.А., Диордица С.В., Анджапаридзе О.Г., Веса В.С.; заявитель и патентообладатель: Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы. – 4857501/13; заявл. 06.08.1990; опубл. 30.10.1994.

27. Пат. № 2002108326 (13) А Российская Федерация. Полифункциональная фармацевтическая композиция на основе L-лизин- α -оксидазы из гриба рода *Trichoderma* и способ получения этого фермента И.П. Смирнова, К.А. Смирнов, А.А. Родькин; заявитель и патентообладатель: Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы. заявл. 03.04.2002; опубл. 27.07.2004

28. Покровский В. С. Ферментные препараты в онкогематологии: актуальные направления экспериментальных исследований и перспективы клинического применения / В.С. Покровский, Е.М. Трещалина // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2014. – Т. 7. – №. 1. – С. 28-38.

29. Потапова О.Л. Каталитические свойства L-лизин- α -оксидазы / О.Л. Потапова, И.П. Смирнова, В.С. Веса, О.М. Быкова // Вопросы мед. химии. – 1992. – Т. 38. – № 1. – С. 9-13.

30. Садыкова В.С. Антимикробная активность видов *T. asperellum*, *T. citrinoviride* и *T. harzianum* / В.С. Садыкова, А.В. Кураков, А.Е. Лысенко // Успехи медицинской микологии. – 2013. – Т. 11. – С. 365-367.

31. Садыкова, В.С. Антимикробная активность веществ, продуцируемых штаммом *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ f-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептаибиологов / В.С. Садыкова, А.В. Кураков, В.А. Коршун, Е.А. Рогожин, Т.И. Громовых, А.Е. Куварина, А.А. Баранова // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60. – №. 11-12. – С. 3-8.

32. Сидорова И.И. Биологические методы борьбы с фитопатогенными грибами // Итоги науки и техники. Сер. Защита раст. М.: ВИНТИ. – 1980. – Т. 2. – С. 116-157.

33. Скворцов Е.В. Биосинтез ксиланаз аборигенными изолятами *Trichoderma* / Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, Д.М. Абузярова // Вестник казанского технологического университета. – 2005.– №1. – С. 251-255.

34. Смирнова, И.П. Факторы регуляции L-лизин-альфа-оксидазной активности / И.П. Смирнова, Т.Т. Березов // Микробиология. – 1987. – Т.56. – С.708-709.

35. Смирнова, И.П. Орто-дианизидиновый микрометод определения активности L-фенилаланин-а-оксидазы / И.П. Смирнова, Т.Т. Березов // Вопросы мед. химии. –1988. – Т. 34. – № 2. – С. 129 -131.
36. Смирнова, И.П. К вопросу изучения механизма связи ВИЧ-инфекции с аутоиммунитетом / И.П. Смирнова, С.Б. Алексеев, Т.Т. Березов // Вопр. мед. химии. –1996. – Т. 42, – № 3. – С. 211-216.
37. Смирнова, И.П. Влияние L-лизин-а-оксидазы на репродукцию вируса герпеса простого первого типа *in vitro*. / И.П. Смирнова, С.В. Диордица, С.Б. Алексеев, И.З. Зайцев // Вопр. Мед. Химии. –1998. – Т. 44. – № 4. – С. 384-387.
38. Смирнова, И.П. Влияние L-лизин-а-оксидазы на развитие герпетической генитальной инфекции у морских свинок. / И.П. Смирнова, С.Б. Алексеев, С.В. Диордица, В.С. Веса, И.З. Зайцев // Бюл. эксперим. биологии и медицины. –1999. – Т. 128. – № 12. – С. 654-656.
39. Смирнова, И.П. Воздействие L-лизин- α -оксидазы на карциному кожи мышей, индуцированную метилхолантронем / И.П. Смирнова, Я. Диджяпетрене, С.Б. Алексеев, В.М. Подборонов, В.С. Орлова // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – Т. 46. – № 4. – С. 13-15.
40. Смирнова, И.П. Биосинтез противоопухолевого фермента L-Лизин- α -оксидазы *Trichoderma* spp. / И.П. Смирнова, С.Б. Алексеев, А.А. Шевченко // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. – №54. – С. 8-12.
41. Смирнова, И.П. Исследование активности L-лизин- α -оксидазы в опытах *in vitro* на моделях вирусов Синдбис, клещевого энцефалита, Западного Нила, Тягиня и Дхори / И. П. Смирнова, В.Ф. Ларичев, Ю.А. Шнейдер // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60. – №. 3-4.
42. Смирнова И. П., Каримова Е. В., Шнейдер Ю. А. Антибактериальная активность L-лизин- α -оксидазы из триходермы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. – №. 6. – С. 743-745.
43. Ташпулатов Ж. Грибы рода *Trichoderma* Pers. Fr. и их использование при переработке отходов растениеводства / Автореферат диссертации доктора биологических наук: 03.02.03/ МГУ. – Москва, 1987. 45 с.
44. Титова, Ю.А. Двухэтапная конверсия отходов с помощью *Pleurotus ostreatus* и *Trichoderma harzianum* / Ю.А. Титова, Л.Б. Хлопунова, Д.В. Коршунов // Микол. и фитопатол. – 2002. – Т.36. – № 5. – С. 64-70.

45. Тиунова, Н.А. Образование, α и β -глюканаз и хитиназы при глубинном культивировании микофильных грибов / Н.А. Тиунова, Н.М. Жлоба, И.И. Сидорова // Микол. и фитопатол. – 1982. – Т.16. – №4. – С. 330-334.
46. Хадуев С.Х. Сравнительные и следования эффекта L- лизин альфа оксидазы из *Trichoderma harzianum* Rifai и *Trichoderma viride* на синтез нуклеиновых кислот в опухолевых клетках человека / С.Х. Хадуев, О.С. Жукова, Я.В. Добрынин, К. Сода, Т.Т. Березов // Бюлл.экспер.биол.мед. –1986. –№5. – С.603-604.
47. Хадуев С.Х. Влияние L-лизин-альфа-оксидазы на репродукцию вируса герпеса простого первого типа in vitro / С.Х. Хадуев, О.С. Жукова, Я.В. Добрынин, К. Сода, Т.Т. Березов // Бюлл.экспер.биол.мед. – 1987. – №4. – С.458-460.
48. Шнейдер, Ю. А., Исследование L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai. / Автореф. диссертации кандидата биологических наук: 03.02.03 / Рос. ун-т дружбы народов. - Москва, 2012. 24 с.
49. Ярошик Л.В. Оксидазы L-аминокислот и перспективы их практического применения/ Л.В. Ярошик, С.И. Дихтярев // Укр. биохим. журн. – 1995. – Т. 67. – № 2.1. – С. 18-24.
50. Abe, Y. Characterization of an apoptosis-inducing factor in *Habu* snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro / Y. Abe, Y. Shimoyama, H. Munakata, J. Ito, N. Nagata, K. Ohtsuki // Biol. Pharm. Bull. – 1998. – Vol. 21, № 9. – P. 924-927.
51. Ahn, M.Y. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) / M.Y. Ahn, B.M. Lee, Y.S. Kim // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 1997. – Vol. 29, № 6. – P. 911–919.
52. Ahn, M. Y. Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs / M.Y. Ahn, K.S. Ryu, Y.W. Lee, Y.S. Kim // Arch. Pharm. Res. – 2000. – Vol. 23. – P. 477-481.
53. Alarcon, F.J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* / F.J. Alarcon, T.F. Martinez, P. Barranco, T. Cabello, M. Diaz, F.J. Moyano // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2002. – Vol. 32. – P. 265-274.
54. Ali, S. A. Isolation, structural, and functional characterization of an Apoptosis-Inducing L-amino acid oxidase from *Leafnosed viper (Eristocophis macmahoni)* snake venom / S.A. Ali, S. Stoeva, A. Abbasi, J.M. Alam, R. Kayed, M. Faigle, B. Neumeister, W. Voelter // Arch. Biochem. Biophys. –2000. –Vol. 84, № 2. – P. 216-226.
55. Almassi, F. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum* / F. Almassi, E.L. Ghisalberti, M.J. Narbey, K. Sivasithamparam // Journal of Natural Products. – 1991. – Vol. 54, № 2. – P. 396-402.

56. Alves, R.M. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom / R.M. Alves, G.A. Antonucci, H.H. Paiva, A.C. Cintra, J.J. Franco, E.P. Mendonça-Franqueiro, D.J. Dorta, J.R. Giglio, J.C. Rosa, A.L. Fuly, M. Dias-Baruffi, A.M. Soares, S.V. Sampaio // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2008. – Vol. 151, № 4. – P. 542-550.
57. Amano, M. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride* / M. Amano, H. Mizuguchi, T. Sano, H. Kondo, K. Shinyashiki, J. Inagaki, T. Tamura, T. Kawaguchi, H. Kusakabe, K. Imada, K. Inagaki // *J. Biochem.* – 2015. – Vol. 157. – P. 549-559.
58. Ande, S.R. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom / S.R. Ande, P.R. Kommoju, S. Draxl, M. Murkovic, P. Macheroux, S. Ghisla, E. Ferrando-May // *Apoptosis.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1439-1451.
59. Beaman, J.G. Genital herpes: a review / J.G. Beaman // *American Family Physician.* – 2005. – V. 72, № 8. – P. 1527-1534.
60. Berges, T. Cloning of an *Aspergillus niger* invertase gene by expression in *Trichoderma reesi* / T. Berges, C. Barreau, J.F. Peberdy, I.M. Boddy // *Curr. Genet.* – 1993. – Vol. 24. – P. 53-59.
61. Bernsdorff, F. Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and independent pathways / F. Bernsdorff, A.C. Döring, K. Gruner, S. Schuck, A. Bräutigam, J. Zeier // *The Plant Cell.* – 2015. – P. TPC2015-00496-RA.
62. Bockholt, R. Partial amino acid sequence of an L-amino acid oxidase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301, cloning and DNA sequence analysis of the *aoxA* gene./ R. Bockholt, B. Masepohl, V. Kruft, B. Wittmann-Liebold, E.K. Pistorius // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1264. – P. 289-293.
63. Böhmer, A. A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties / A. Böhmer, A. Müller, M. Passarge, P. Liebs, H. Honeck, H. Müller // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – Vol. 182, № 2. – P. 327-332.
64. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / M.M. Bradford. // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
65. Braun, M. Purification and some properties of an extracellular L-amino acid oxidase from *Cellulomonas cellulans* AM8 isolated from soil / M. Braun, J.M. Kim, R.D. Schmid // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – Vol. 37. – P. 594–598.
66. Brearley, G. M. Purification and partial characterisation of a broad-range L-amino acid oxidase from *Bacillus carotarium* 2Pfa isolated from soil / G.M. Brearley, C.P. Price, T. Atkinson,

P.M. Hammond // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1994. – Vol. 41, № 6. – P. 670-676.

67. Brückner, H. Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by HPLC with field desorption and fastatom bombardment mass spectrometry / H. Brückner, M. Przybylski // Journal of Chromatography. – 1984. – Vol. 296. – P. 263-275.

68. Butzke, D. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata* / D. Butzke, R. Hurwitz, B. Thiede, S. Goedert, T. Rudel // Toxicon. – 2005. – Vol. 46. – P. 479-489.

69. Byfield, M. Biochemical aspects of biosensors / M. Byfield, R. Abuknesha // Biosen. Bioelectron. – 1994. – Vol. 9, № 4-5. – P. 373-400.

70. Calderon, J. A *Neurospora crassa* Mutant Altered in the Regulation of L-Amino Acid Oxidase / J. Calderon, L. Olvera, L.M. Martinez, G. Davila // Microbiology. – 1997. – Vol. 143. – P. 1969–1974.

71. Cen, X. Investigation on recombinant hirudin via oral route / X. Cen, J. Ni, T. Tan, X. Liu, C. Li, J. Chen, Y. Huang, S. Zhu, Q. Bi // Peptides. – 2006. – Vol. 27, № 4. – P. 836-840.

72. Chen, W.M. Investigating antimicrobial activity in *Rheinheimera* sp. due to hydrogen peroxide generated by L-lysine oxidase activity / W.M. Chen, C.Y. Lin, S.Y. Sheu // Enzyme and Microbial Technology. – 2010. – Vol. 46, № 6. – P. 487-493.

73. Chen, S. Oxidative deamination of sulfur amino acids by bacterial and snake venom L-amino acid oxidase / S. Chen, J. Walgate, J. Duerre // Arch. Biochem. Biophys. – 1971. – Vol. 146. – P. 54-63.

74. Ciscotto P. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom / P. Ciscotto, R.A. Machado de Avila, E. A. Coelho, J. Oliveira, C.G. Diniz, L.M. Fariás, M.A. Carvalho, W.S. Maria, E.F. Sanchez, A. Borges, C. Chávez-Olórtegui // Toxicon. – 2009. – Vol. 53. – P. 330–341.

75. Claydon, N. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. / N. Claydon, M. Allan, J.R. Itanson, A.G. Avent // Transactions of the British Mycological Society. – 1987. – Vol. 88. – P. 503-513.

76. Curti, B. Inactivation of Snake Venom L-Amino Acid Oxidase by Freezing / B. Curti, V. Massey, M. Zmudka // J. Biol. Chem. – 1968. – Vol. 243. – P. 2306-2314.

77. Da Silva R. J. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. / R.J. Da Silva, M.G. Da Silva, L.C. Vilela, D. Fecchio // Mediators Inflamm. – 2002. – Vol. 11. – P. 99-104.

78. Dalton T. Regulation of gene expression by reactive oxygen / T. Dalton, H. Sherzer, A. Puga // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1999. – Vol. 39. – P. 67-101.

79. Danielson, R.M. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* / R.M. Danielson, C.B. Daney // Soil Biol. Biochem. – 1973. – Vol. 5, № 5. – P. 505-515.
80. Davet, P. Natural soil populations of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* / P. Davet // Soil Biology and Biochememistry. – 1985. – Vol. 17 – P. 585–586.
81. De Vieira Santos, M.M. Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom / M.M. De Vieira Santos, C.D. Sant'Ana, J.R. Giglio, R.J. Da Silva, S.V. Sampaio, A.M. Soares, D. Fecchio // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2008. – Vol. 102, № 6. – P. 533-542.
82. Dennis, C. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* Production of volatile antibiotics / C. Dennis, J. Webster // Trans. Br. Mycol. Soc. – 1971. – Vol. 7. – P. 41-48.
83. Dhiman, T.R. Perfomance of diary cown fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding / T.R. Dhiman, Zaman M.S., Gimenez R.R., Walters J.L., Treacher R. // Animal Feed and Technology. – 2002. – Vol. 101. – P. 115-125.
84. Du X.Y. Snake venom L-amino acid oxidases / X.Y. Du, K.J. Clementson // Toxicon. – 2002. – Vol. 40, № 6. – P.659-665.
85. Duerre, J.A. L-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri* / J.A. Duerre, S. Chakrabarty // J. Bacteriol. – 1975. – Vol. 121, № 2. – P. 656- 663.
86. Dunlop, R.W. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens / R.W. Dunlop, A. Simon, K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti //Journal of Natural Products. – 1989. – Vol. 52, № 1. – P. 67-74.
87. Eckstein, R. M. Amino acid oxidase of leukocytes in relation to H₂O₂-mediated bacterial killing / R. M. Eckstein, R.L. Baehner, D.G. Nathan // J. Clin. Invest. – 1971. – Vol. 50, № 9. – P. 1985–1991.
88. Ehara T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. / T. Ehara, S. Kitajima, M. Kanazawa, T. Tamiya, T. Tsuchiya // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 531. – P. 509-512.
89. El-Sayed, A.S. Microbial L-methioninase: production, molecular characterization, and therapeutic applications / A.S. El-Sayed // Applied microbiology and biotechnology. – 2010. – Vol. 86, №. 2. – P. 445-467.
90. Faust, A. The structure of bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation / A. Faust, K. Niefind, W. Hummel, D. Schomburg // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 367. – P. 234–248
91. Fernandes, H.S. Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections / H.S. Fernandes, C.S. Silva Teixeira, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, N.M. Cerqueira //Expert opinion on therapeutic patents. – 2017. –Vol. 27, № 3. – P. 283-297.

92. França, S.C. Molecular approaches for structural characterization of Bothrops L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. / S.C. França, S. Kashima, P.G. Roberto, M. Marins, F.K. Ticli, J.O. Pereira, S. Astolfi-Filho, R.G. Stábeli, A.J. Magro, M.R. Fontes, S.V. Sampaio, A.M. Soares // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 355, № 2. – P. 302-306.
93. Franco, P.F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* Strain T4 / P.F. Franco, H.M. Ferreira, E.X. Filho // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2004. – Vol. 6. – P. 32-40.
94. Galante, Y.M. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. *Trichoderma & Gliocladium-Enzymes, biological control and commercial applications* / Y.M. Galante, A. De Conti, R. Monteverdi // London: Taylor & Francis. – 1998. Vol. 2. – P. 327–342.
95. Geueke B. A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. / B. Geueke, W. Hummel // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2002. – Vol. 31, №1-2. – P. 77-87.
96. Geyer A. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. / A. Geyer, T.B. Fitzpatrick, P.D. Pawelek, K. Kitzing, A. Vrieling, S. Ghisla, P. Macheroux // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 4044-4053.
97. Ghisalberti, E.L. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum* / E.L. Ghisalberti, C.Y. Rowland, // *J. Nat. Prod.* – 1993. – Vol. 56. – P. 1799–1804.
98. Ghisalberti, E.L. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrenes / E.L. Ghisalberti, M.J. Narbey, M.M. Dewan, K. Sivasithamparam // *Plant and Soil.* – 1990. – Vol. 121. – P. 287–291.
99. Ghisalberti, E.L. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. / E.L. Ghisalberti, K. Sivasithamparam, // *Soil Biol. Biochem.* – 1991. – Vol. 23. – P. 1011-1020.
100. Goldman, G.H. A simple screening of the cellulolytic activity of *Trichoderma* spp. isolates in comparison with *Trichoderma reesei* QM9414. / G.H. Goldman, O.J. Lucio de Azeved // *Arqu. Biol. Technol. Curitiba* – 1987. – Vol.30. – P. 267-273.
101. Gómez-Alarcón, G. Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos. / G. Gómez-Alarcón, M. A. de la Torre // *Microbiología* – 1994. – Vol.10. – P.111-120.
102. Hanane-Fadila, Z.M. Purification, characterization and antibacterial activity of L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* / Z.M. Hanane-Fadila, L.D. Fatima // *J Biochem Mol Toxicol.* – 2014. – Vol. 28, № 8. – P. 347-354.

103. Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22 / G.E. Harman // Plant Dis. – 2000. – Vol. 84. – P. 377-393.
104. Harman, G.E. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts / G.E. Harman, C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito // Nature Reviews. – 2004. – Vol. 2. – P. 43-56.
105. Hashmi, M. Enzymatic reaction of beta-N-methylaminoalanine with L-amino acid oxidase / M. Hashmi, M. Anders // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – Vol. 1074, № 1. – P. 36-39.
106. Holme, D. Coupled optical rate determinations of amino acid oxidase activity / D. Holme, D. Goldberg // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – Vol. 377, № 1. – P. 61-70.
107. Holmes, K. A. *Trichoderma ovalisporum*: a new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa / K.A Holmes, H.J Schroers, S.E. Thomas, H.C. Evans, G.J. Samuels // Mycol. Prog. – 2004. – Vol. 3, № 3. – P. 257-263.
108. Hou, C.T. New mycotoxin, trichotoxin A, from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. / C.T. Hou, A. Ciegler, C.W.Hesseltine // Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 23. – P. 183–185.
109. Hu, H.M. Purification and characterization of L-lysine oxidase from *Trichoderma pseudokonigii* and its effect on growth of mouse erythroleukemia cells / H.M. Hu, S.W. Cheng, M.C. Huang, S.J. Tang // JOURNAL-CHINESE AGRICULTURAL CHEMICAL SOCIETY. – 1994. – Vol. 32. – P. 361-367.
110. Hu, R. Isolation and properties of L-amino acid oxidase from *Ophiophagus hannah* venom / R. Hu, J. Wang, K. Lei // Sci. Sin. B. – 1982. – Vol. 25, № 9. – P. 941-952.
111. Hutchinson, S.A. Identification and biological effects of volatile metabolites from cultures of *Trichoderma harzianum*. / S.A. Hutchinson // Trans. Br. Mycol. Soc. – 1972. – Vol. 59. – P. 71–77.
112. Iijima R. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. / R. Iijima, J. Kisugi, M. Yamazaki // Dev. Comp. Immunol. – 2003. – Vol. 27, № 4. – P. 305-311.
113. Iijima, R. L-amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity / R. Iijima, J. Kisugi, M. Yamazaki // Dev. Comp. Immunol. – 2003. – Vol. 27, № 6-7. – P. 505 -512.
114. Ito, K. Purification and some properties of L-amino acid oxidase from *Amphiroa crassissima* Yendo / K. Ito, K. Hori, K. Miyazawa // Hydrobiologia. – 1987. – Vol. 151-152. – P. 563–569.
115. Izidoro L.F. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. / L.F. Izidoro, M.C. Ribeiro, G.R. Souza, C.D.

Sant'Ana, A. Hamaguchi, M.I. Homsí-Brandeburgo, L.R. Goulart, R.O. Belebóni, A. Nomizo, S.V. Sampaio, A.M. Soares, V.M. Rodrigues // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 14, № 20. – P. 7034-7043.

116. Webster, J. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridian / J. Webster, N. Lomas. // *Transactions of The British Mycological Society*. – 1964. – Vol. 47, № 4. – P. 535-540.

117. Jin, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom. / Y. Jin, W.H. Lee, L. Zeng, Y. Zhang // *Toxicon*. – 2007. – Vol. 50, №.4. – P. 479-489.

118. Jung, S.K. Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis. / S.K.Jung, A. Mai, M. Iwamoto, N. Arizono, D. Fujimoto, K. Sakamaki, S. Yonehara // *J. Immunol*. – 2000. – Vol. 165, №.3. – P. 1491-1497.

119. Kanzawa, N. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms / N. Kanzawa, S. Shintani, K. Ohta, S. Kitajima, T. Ehara, H.Kobayashi, H. Kizaki, T. Tsuchiya // *Archives of biochemistry and biophysics* – 2004. – Vol. 422, №.1. – P. 103-109.

120. Kasai, K. Novel L-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. / K. Kasai, T. Ishikawa, T. Komata, K. Fukuchi, M. Chiba, H. Nozaka, T. Nakamura, T. Sato, T. Miura // *FEBS J*. – 2010. – Vol. 277, № 2. – P. 453-465.

121. Keen, J.H. Receptor-mediated endocytosis of diphtheria toxin by cells in culture / J.H. Keen, F.R. Maxfield, M.C. Hardegree, W.H. Habig // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1982. – Vol. 79, № 9. – P. 2912–2916.

122. Kinghorn, J.R. *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi* / J.R. Kinghorn, G.Turner – Springer: Netherlands. – 1992. – P. 207- 222.

123. Kitani, Y. Antibacterial action of L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. / Y. Kitani, N. Kikuchi, G. Zhang, S. Ishizaki, K. Shimakura, K. Shiomi, Y. Nagashima // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol*. – 2008. – Vol. 149. – P. 394-400.

124. Ko, K.C. Identification of potent bactericidal compounds produced by escapin, an L-amino acid oxidase in the ink of the sea hare *Aplysia californica*. / K.C. Ko, B. Wang, P. C. Tai, C.D. Derby // *Antimicrob. Agents Chemother*. – 2008. – Vol. 52, № 12. – P. 4455-4462.

125. Koyama, H. Oxidation and oxygenation of L-amino acids catalyzed by a L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501/ H. Koyama // *J. Biochem*. – 1984. – Vol. 96, № 2. – P. 421-427.

126. Kredics, L. *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential / L. Kredics, Z. Anta, L. Manczinger, A. Szekeres, F. Kevei, Nagy E. // *Food Technol. Biotechnol*. – 2003. – Vol. 41, № 1. – P. 37-42.

127. Krupyanko, V.I. A vector method of representation of enzymatic reactions / V.I. Krupyanko – Moscow: Nauka. – 1990, – P. 100-144
128. Krupyanko, V.I. Additional possibility of data analysis of enzyme inhibition and activation. A choice of equations for calculation of the initial reaction rates in enzyme inhibition and activation / V.I. Krupyanko // J. Biol. Sci. – 2007. – Vol. 7. – P. 506-513.
129. Krupyanko, V.I. An additional Possibility of Using the Hill Coefficients / V.I. Krupyanko // European Chemical Bulletin. – 2015. Vol. 4, № 7-9. – P. 340-342.
130. Kubicek, C.P. Cellulase formation by species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. with anamorphs referable to *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. / C.P. Kubicek, U.M. Bözlzbauer, W. Kovacs, R.L. Mach, K. Kuhls, E. Lieckfeldt, T. Börner, G.J. Samuels // Fungal Genet. Biol. – 1996. –Vol. 20. – P. 105-114.
131. Kubicek C.P. Trichoderma: from genes to biocontrol / C.P. Kubicek, R.L. Mach, C.K. Peterbauer, M. Lorito // J. of Plant Pathology. – 2001. – Vol. 83, № 2. – P. 11-23.
132. Kuhad, R.C. Microbial cellulases and their industrial applications / R.C. Kuhad, R. Gupta, A. Singh // Enzyme research. – 2011. – Vol. 2011. Article ID 280696.
133. Kurganov B.I. Allosteric enzymes: kinetic behavior / B.I. Kurganov – Cell Biochem. Funct.: John Wiley & Sons. –1982. – Vol. 1. – 187 p.
134. Kusakabe, H. Occurrence of a Novel Enzyme, l-Lysine Oxidase with Antitumor Activity in Culture Extract of *Trichoderma viride* / H. Kusakabe, M. Sugi, K. Kodama, A. Kuninaka, H. Yoshino, K. Soda // Agr. Biol. Chem. – 1979. – Vol. 43. – P.1371-1373.
135. Kusakabe, H. A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties / H. Kusakabe, K. Kodama, A. Kuninaka, H. Yoshino, H. Misono, K. Soda // J. Biol. Chem. – 1980. – Vol. 255, № 3. – P. 976-981.
136. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. –Vol. 227. – P. 680 - 685
137. Li, Z.Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation / Z.Y. Li, T.F. Yu, E.C. Lian // Toxicol. – 1994. –Vol. 32. – P. 1349-1358.
138. Liu, Y. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of recombinant hirudin via four non-parenteral routes / Y. Liu, W.L. Lu, X. Zhang, X.Q. Wang, H. Zhang, Q. Zhang // Peptides. – 2005. –Vol. 26, № 3. – P.423-430.
139. Lieckfeldt, E. *Trichoderma aureoviride*: Phylogenetic position and characterization / E. Lieckfeldt, M. Kullnig, C.P. Kubicek, G.J. Samuels, T. Börner // Mycol. Res. – 2001. – Vol.105. – P. 313-322.

140. López-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy / M. López-Lázaro // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 8, № 1. – P. 1-8.
141. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193. – P. 265-275.
142. Lu Q.M. L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects / Q.M. Lu, Q. Wei, Y. Jin, J.F. Wei, W.Y. Wang, Y. Xiong // *Journal of Natural Toxins.* – 2002. – Vol. 11, №.4. – P. 345–352.
143. Lucas-Elío, P. The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity/ P. Lucas-Elío, D. Gómez, F. Solano, A. Sanchez-Amat, // *J Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – P. 2493-2501.
144. MacHeroux, P. L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme / P. MacHeroux, O. Seth, C. Bollschweiler, M. Schwarz, M. Kurfürst, L.C. Au, S. Ghisla // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 1679-1686.
145. Mai-Prochnow, A. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several Gram-negative bacteria / A. Mai-Prochnow, P. Lucas-Eli, S. Egan, T. Thomas, J.S. Webb, A. Sanchez-Amat, S. Kjelleberg // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190. – P. 5493-5501.
146. Manczinger, L. Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates / L. Manczinger, G. Polner // *System. Appl. Microbiol.* – 1985. – Vol. 9. – P. 214–217.
147. Mandal, S. Two L-amino acid oxidase isoenzymes from Russell's viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanisms of inhibition by substrate analogs / S. Mandal, D. Bhattacharyya // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, № 9. – P. 2078-2095.
148. Mason J. M. Interleukin-four induced gene-1 (IL4i1) is a leukocyte L-amino acid oxidase with an unusual acidic pH preference and lysosomal localization / J.M. Mason, M.D. Naidu, M. Barcia, D. Porti, S.S. Chavan, C.C. Chu // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173. – P. 4561-4567.
149. Massey, V. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase / V. Massey, B. Curti // *J. Biol. Chem.* – 1967. – Vol. 242. – P. 1259-1264.
150. Middlebrook, J.L. Effects of lectins on the interaction of diphtheria toxin with mammalian cells / J.L. Middlebrook, R.B. Dorland, S.H. Leppla // *Exp. Cell Res.* – 1979. – Vol. 121, № 1. – P. 95–101.
151. Morawetz, R. Presence transcription and translation of cellobiohydrolase genes in several *Trichoderma* species / R. Morawetz, F. Gruber, R. Messner, C. Kubicek // *Curr. Genet.* – 1992 – Vol. 21. – P. 31-36.

152. Morris, R.E. Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation / R.E. Morris, A.S. Gerstein, P.F. Bonventre, C.B. Saelinger // *Infect. Immun.* – 1985. – Vol. 50, № 3. – P. 721-729.
153. Moustafa, I.M. Crystal Structure of LAAO from *Calloselasma rhodostomum* with an L-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism / I.M. Moustafa, S. Foster, A.Y. Lyubimov, A. Vrielink // *Journal of Molecular Biology.* – 2006. – Vol. 364. – P. 991-1002.
154. Murakawa, M. Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms / M. Murakawa, S.K. Jung, K. Iijima, S. Yonehara // *Cell Death Differ.* – 2001. – Vol. 8, № 3. – P. 298-307.
155. Mutoh N. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide / N. Mutoh, C.W. Nakagawa, Y. Hayashi // *FEMS Microbiol. Letters.* – 1995. – Vol. 132, № 1-2. – P. 67-72.
156. Murthy, S.N. Identification of L-amino acid L-lysine alpha-amino oxidase in mouse brain / S.N. Murthy, M.K. Janardanasarma // *Mol. Cell Biochem.* – 1999. – Vol. 197, № 1-2. – P. 13-23.
157. Nagashima, Y. Isolation and cDNA cloning of an antibacterial L-amino acid oxidase from the skin mucus of the great sculpin *Myoxocephalus polyacanthocephalus* / Y. Nagashima, C. Tsukamoto, Y. Kitani, S. Ishizaki, H. Nagai, T. Yanagimoto // *Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochemistry and molecular biology.* – 2009. – Vol. 154. – P. 55–61.
158. Nakajima, H. Immobilization of *Pseudomonas* L-Phe oxidase on a nylon membrane for possible use as an amino acid sensor / H. Nakajima, H. Koyama, H. Suzuki // *Agric. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 55, № 12. – P. 3117-3118.
159. Nakano, M. Crystalline mammalian L-amino acid oxidase from rat kidney mitochondria. / M. Nakano, T.S. Danowski // *J. Biol. Chem.* – 1966. – Vol. 241. – P. 2075-2083.
160. Nathan, I. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂ / I. Nathan, A. Dvilansky, T. Yirmiyahu, M. Aharon, A. Livne // *Thromb Haemost.* – 1982. – Vol. 48, № 3. – P. 277-282.
161. Návarová, H. Pípecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity / H. Návarová, F. Bernsdorff, A.C. Döring, J. Zeier // *The Plant Cell.* – 2012. – P. tpc. 112.103564.
162. Nelson, R.S. Virus Tolerance, Plant Performance of Transgenic Tomato Plants Expressing Coat Protein from Tobacco Mosaic Virus / R.S. Nelson, S.M. McCormick, X. Delannay // *Nature Biotechnol.* – 1988. – Vol. 6. – P. 403-409.

163. Niedermann, D.M. Molecular cloning of the L-amino-acid oxidase gene from *Neurospora crassa* / D.M. Niedermann, K. Lerch // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265, №. 28. – P. 17246-17251.
164. Nuutinen, J.T. Identification of nitrogen mineralization enzymes, L-amino acid oxidases, from the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma* spp. and *Laccaria bicolor* / J.T. Nuutinen, S. Timonen // Mycological Research. – 2008. – Vol. 112, №. 12. – P. 1453-1464.
165. Okuda, T. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics / T. Okuda, A. Fujiwara, M. Fujiwara // Agric. Biol. Chem. – 1982. Vol. 46. – P. 1811-1822.
166. Oron, U. Processing of snake venom L-amino acid oxidase during intracellular transport / U. Oron, D. Roth, A. Bdolah // Exp. Cell Res. – 1982. – Vol. 140, №. 2. – P. 383-388.
167. Otsuka-Fuchino, H. Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant African snail / H. Otsuka-Fuchino, Y. Watanabe, C. Hirakawa, T. Tamiya, J. Matsumoto, T. Tsuchiya // Comp. Biochem. Physiol. C. – 1992. – Vol. 101, №. 3. – P. 607-613.
168. Papavizas, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol / G.C. Papavizas // Annu. Rev. Phytopathol. – 1985. № 23. – P.23-54.
169. Patent USA 5422107. *Trichoderma harzianum* SK-55 fungus, fungicide containin it, and method of manufacture of the same and its use. / T. Kubota; Hokkaido Green Kosan Inc. Issued 06.06.95.
170. Patent USA 6512166. Combination of fungul cell degrading enzyme and fungul cell membrane affecting compound / G.E. Harman, M. Lorito, A. Pietro, C.K. Hayes, F. Scala, C.P. Kubicek; Issued. 28. 01. 2003.
171. Pawelek, P.D. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site / P.D. Pawelek, J. Cheah, R. Coulombe, P. Macheroux, S. Ghisla, A. Vrieling // EMBO J. – 2000. – Vol. 19. – P. 4204-4215.
172. Pessatti, M. Screening of Bothrops snake venoms for L-amino acid oxidase activity / M. Pessatti, J.D. Fontana, M.F. Furtado, M.F. Guimãraes, L.R. Zanette, W.T. Costa, M. Baron // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1995. – Vol. 51-52. – P. 197-210.
173. Piedra, P. Purification and characterization of an L-amino-acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii* / P. Piedras, M. Pineda, J. Muñoz, J. Cárdenas // Planta. – 1992. – Vol. 188. – P. 13-18.
174. Pistorius, E. Some properties of a basic L-amino acid oxidase from *Anacystis nidulans* / E. Pistorius, H. Voss // II Biochim. Biophys. Acta. – 1980. – Vol. 611, № 2. – P. 227-240.

175. Pitzschke, A. Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling / A. Pitzschke, H. Hirt // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 149, № 2. – P. 606-615.
176. Pokrovsky, V.S. Amino Acid Degrading Enzymes and Their Application in Cancer Therapy / V.S. Pokrovsky, O.E. Chepikova, D.Z. Davydov, A.A. Zamyatnin, A.N. Lukashev, E.V. Lukasheva // *Current. Medicinal. Chemistry*. – 2017. DOI: 10.2174/0929867324666171006132729
177. Pokrovsky, V.S. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF- 4268D / V.S. Pokrovsky, H.M. Treshalina, E.V. Lukasheva, A.G Medentzev, A.Yu. Arinbasarova, T.T. Berezov // *Anti-Cancer Drugs*. – 2013. – Vol. 24, № 8. – P. 846-851.
178. Pollegoni, L. Characterization of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* / L. Pollegoni, S. Buto, W. Tischer, S. Ghisla, M. Pilone // *Biochemistry and molecular biology international*. – 1993. – Vol. 31, № 4. – P. 709-717.
179. Pollegioni, L. L-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? / L. Pollegioni, P. Motta, G. Molla // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – Vol. 97, №. 21. – P. 9323-9341.
180. Ponnudurai, G. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. / G. Ponnudurai, M.C. Chung, N.H. Tan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – Vol. 313. – P. 373-378.
181. Porter, D.T. Interpretation of the pH dependence of flavin reduction in L-amino acid oxidase reaction / D.T. Porter, H.J. Bright // *J. Biol. Chem.* – 1980. – Vol. 255. – P. 2969 - 2975.
182. Puiffe M.L. Antibacterial properties of the mammalian L-amino acid oxidase IL4I1 / M.L. Puiffe, I. Lachaise, V. Molinier-Frenkel, F. Castellano // *PLoS One*. – 2013. – Vol.8, №1. – P.e54589.
183. Rui, C. Amperometric flow injection analysis of creatinine based on immobilized creatinine deiminase, leucine dehydrogenase and L-amino acid oxidase / C. Rui, Y. Kato, K. Sonomoto // *Biosens. Bioelectron.* – 1994. – Vol. 9, № 6. – P. 429-437.
184. Sabatino, M.A. Enhancement of in vivo antitumor activity of classical anticancer agents by combination with the new, glutathione-interacting DNA minor groove-binder, brostallicin / M.A. Sabatino, T. Colombo, C. Geroni, S. Marchini, M. Brogginì // *Clin Cancer Res*. – 2003. – Vol. 9, № 14. – P. 5402-5408.
185. Sakurai, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom / Y. Sakurai, H. Takatsuka, A. Yoshioka, T. Matsui, M. Suzuki, K. Titani, Y. Fujimura // *Toxicon*. – 2001. – Vol. 39. – P. 1827-1833.

186. Samel, M. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom / M. Samel, H. Vija, G. Rönholm, J. Siigur, N. Kalkkinen, E. Siigur // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1764. – P. 707-714.
187. Samuels, G.J. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus* / G.J. Samuels, S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury, O. Petrini, // *Mycologia.* – 2002. № 94. – P.146-170.
188. Samuels, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus / G.J. Samuels // *Mycol. Res.* – 1996. – Vol. 100, № 8. – P. 923-935.
189. Samuels, G.J. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* / G.J. Samuels, O. Petrini, K. Kuhls, E. Lieckfeldt, C.P. Kubicek, // *Stud Mycol.* – 1998. – Vol. 41. – P. 1-54.
190. Sanchez, E. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (Surucucu Pico de Jaca) *Lachesis muta muta* venom / E. Sanchez, A. Magalhaes // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1981. – Vol. 24, № 3. – P. 249-260.
191. Sant'Ana, C.D. Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence / C. D. Sant'Ana, D.L. Menaldo, T.R. Costa, H. Godoy, V.D. Muller, V.H. Aquino, S. Albuquerque, S.V. Sampaio, M.C. Monteiro, R.G. Stábeli, A.M. Soares // *Biochem. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 76. – P. 279-288.
192. Schnell, S. Validity of the Michaelis–Menten equation—steady-state or reactant stationary assumption: that is the question / S. Schnell // *The FEBS journal.* – 2014. – Vol. 281, № 2. – P. 464-472.
193. Shaw, I.M. The chemistry of peptides related to metabolites of *Trichoderma* spp.: Synthesis of L-prolyl-L-valyl-2-methylalaninyl-2-methylalanine / I.M. Shaw, A. Taylor, // *J. Chem.Soc. Perkin Trans.* – 1979. – Vol. 7. – P. 1866–1870.
194. Sikora, L. Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa* / L. Sikora, G.A. Marzluf // *Mol. Gen. Genet.* – 1982. – Vol. 186, № 1.1. – P. 33-39.
195. Simon, A. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties / A.Simon, R.W Dunlop, E.L Ghisalberti, K. Sivasithamparam // *Soil Biol. Biochem.* – 1988. – Vol. 20. – P. 263–264.
196. Singh, S. Optimization of medium and cultivation conditions for L-amino acid oxidase production by *Aspergillus fumigatus* / S. Singh, B.K. Gogoi, R.L. Bezbaruah // *Canadian Journal of Microbiology.* – 2009. – Vol. 55, № 9. – P. 1096-1102.

197. Singh, S. L-Amino Acid Oxidases-Microbial and Snake Venom / S. Singh // J. Microb. Biochem. Technol. – 2014. –Vol. 6. – P. 128-134.
198. Skarnes, R.C. L-Amino-acid oxidase, a bactericidal system / R.C. Skarnes // Nature. – 1970. – Vol. 225. – P. 1072–1073.
199. Souza D.H. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from agkistrodon contortrix laticinctus snake venom: preliminary crystallographic data / D.H. Souza, L.M. Eugenio, J.E. Fletcher, M.S. Jiang, R.C. Garratt, G. Oliva, H.S. Selistre-de-Araujo // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. –Vol. 368. – P. 285-290.
200. Srivastava, M. Trichoderma Genome to Genomics: A Review/ M. Srivastava, M. Shahid, S. Pandey, A. Singh, V. Kumar, S.Gupta, M. Maurya // J. Data Mining Genomics Proteomics. – 2014. – Vol. 5, №. 162. – P. 2153-0602.
201. Stabeli, R.G. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from snake venom / R.G. Stabeli, S. Marcussi, G.B. Carlos, R.C. Pietro, H.S. Selistre-de-Araujo, J.R. Giglio, E.B. Oliveira, A.M. Soares // Bioorg. Med. Chem. –2004. –Vol. 12, №. 11. – P. 2881-2886.
202. Stabeli, R.G. Cytotoxic L-amino acid oxidase from Bothrops moojeni: biochemical and functional characterization / R.G. Stábeli, C.D. Sant'Ana, P.H. Ribeiro, T.R. Costa, F. K.Ticli, M.G. Pires, A. Nomizo, S. Albuquerque, N.R. Malta-Neto, M. Marins, S.V. Sampaio, A.M. Soares // Int. J. Biol. Macromol. – 2007. – Vol. 41, № 2. – P. 132-140.
203. Sternberg, D. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose / D. Sternberg, S. Doval, // Biotech. Bioeng. – 1980. – Vol. 21. – P. 181–192.
204. Stockwell, V.O. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control / V.O. Stockwell, J.P. Stack, // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97, № 2. – P. 244-249.
205. Suhr, S.M. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis / S.M. Suhr, D.S. Kim // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 224, № 1. – P. 134–139.
206. Suhr, S.M. Comparison of the Apoptotic Pathways Induced by L-Amino Acid Oxidase and Hydrogen Peroxide / S.M. Suhr, D.S. Kim // J. Biochem. – 1999. – Vol. 125, № 2. – P. 305-309.
207. Sun, L.K. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress / L.K. Sun, Y. Yoshii, A. Hyodo, H. Tsurushima, A. Saito, T. Harakuni, Y.P. Li, K. Kariya, M. Nozaki, N. Morine // Toxicol In Vitro. –2003. –Vol. 17, № 2. – P. 169-177.

208. Sun, Y. Characterization and expression of L-amino acid oxidase of mouse milk / Y. Sun, E. Nonobe, Y. Kobayashi, T. Kuraishi, F. Aoki, K. Yamamoto, S. Sakai // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 19080-19086.

209. Takahashi, T. Cyclosporin a promotes hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells / T. Takahashi, A. Kamimura // J Invest Dermatol. – 2001. – Vol. 117. – P.605-611.

210. Takamatsu, N. Molecular cloning of the defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai* / N. Takamatsu, T. Shiba, K. Muramoto, H. Kamiya // FEBS Lett. – 1995. – Vol. 377. – P. 373-376.

211. Takatsuka, H. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation / H. Takatsuka, Y. Sakurai, A. Yoshioka, T. Kokubo, Y. Usami, M. Suzuki, T. Matsui, K. Titani, H. Yagi, M. Matsumoto, Y. Fujimura // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 12. – P. 267-277.

212. Tan, N.H. Isolation and characterization of an unusual form of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom / N.H. Tan, M.N. Saifuddin // Biochem. Int. – 1989. – Vol. 19, № 4. – P. 937-944.

213. Tan, N.H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom / N.H. Tan, S. Swaminathan // Int. J. Biochem. – 1992. – Vol. 24, № 6. – P. 967-973.

214. Taylor, A. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea andits anamorphs, Trichoderma* and *Gliocladium* / A. Taylor // Proc. Nova Scotia Inst. Sci. – 1986. – Vol. 36. – P. 27–58.

215. Theodore, K. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1, 3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum* / K. Theodore, T. Panda // Enzyme and Microbial Technology. – 1995. – Vol. 17, № 12. – P. 1043-1049.

216. Tõnismaägi, K. L-Amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria / K. Tõnismaägi, M. Samel, K. Trummal, G. Rõnnholm, J. Siigur, N. Kalkkinen, E. Siigur // Toxicon. – 2006. – Vol. 48. – P. 227–237.

217. Torii, S. A novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom / S. Torii, M. Naito, T. Tsuruo, I. Apoxin // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 14. – P. 9539–9542.

218. Toyama, M.H. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom / M.H. Toyama, D.O. Toyama, L.F. Passero, M.D. Laurenti, C. E. Corbett, T.Y.

Tomokane, F.V. Fonseca, E. Antunes, P.P. Joazeiro, L.O. Beriam, M.A. Martins, H.S. Monteiro, M.C. Fonteles // *Toxicon*. – 2006. – Vol. 47, № 1. – P. 47-57.

219. Ueda, M. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu snake) / M. Ueda, C. Chang, M. Ohno // *Toxicon*. – 1988. – Vol. 26, № 8. – P. 695-706.

220. Umana, V. Comparative study of the isoenzymes of L-amino acid oxidase from venom of *Bothrops asper* / V. Umana // *Rev. Biol. Trop.* – 1982. – Vol. 30, № 1. – P. 79-84.

221. Vogel-Adghough, D. Pipecolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco / D. Vogel-Adghough, E. Stahl, H. Návarová, J. Zeier // *Plant signaling & behavior*. – 2013. – Vol. 8, №. 11. – P. e26366.

222. Weber, E. L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and characterization / E. Weber, K. Tonder, C. Reinbothe // *J. Basic Microbiol.* – 1994. – Vol.34. – P. 265–276.

223. Wei, X.L. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom / X.L. Wei, J.F. Wei, T. Li, L.Y. Qiao, Y.L. Liu, T. Huang, S.H. He // *Toxicon*. – 2007. – Vol. 50. – P. 1126-1139.

224. Wellner, D. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus* / D. Wellner, A. Meister // *J. Biol. Chem.* – 1960. – Vol. 235. – P. 2013-2018.

225. Widden, P. Fungal populations from forest soils in Southern Quebec. / P. Widden // *Can. J. Bot.* – 1979. – Vol. 57. – P. 1324-1331.

226. Widden, P. Seasonality of *Trichoderma* species in spruce forest soil / P. Widden // *Mycologia*. – 1980. – Vol. 72. – P. 775-784.

227. Widden, P. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter / P. Widden, V. Scattolin // *Mycologia* – 1988. – Vol.80. – P. 795-803.

228. Yang, H. Cloning, characterization, and expression of escapin, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica* / H. Yang, P.M. Johnson, K.C. Ko, M. Kamio, M.W. Germann, P.C. Tai, C.D. Derby // *J. Exp. Biol.* – 2005. – Vol. 208. – P. 3609-3622.

229. Xiong, H. Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates / H. Xiong, N. Van Weymarn, O. Turunen, M. Leisota, O. Pastinen // *Bioresource Technology*. – 2005. – Vol. 96, №.7. – P. 753-759.

230. Yang, C.A. A novel L-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 associated with antagonism of *Rhizoctonia solani* / C.A. Yang, C.H. Cheng, C.T. Lo, S.Y. Liu, J.W. Lee, K.C. Peng // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – Vol. 59, №. 9. – P. 4519-4526.

231. Yang, C.A. Monomeric l-amino acid oxidase-induced mitochondrial dysfunction in *rhizoctonia solani* reveals a novel antagonistic mechanism of *Trichoderma harzianum* ETS 323/ C.A. Yang, C.H. Cheng, C.T. Lo, S.Y. Liu, J.W. Lee, K.C. Peng // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2012. – Vol. 60, № 10. – P. 2464-2471.

232. Yedidia I., Srivastva K. A., Kapulnik Y., Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants // *Plant and Soil*. –2001. – Vol. 235. – P. 235–242.

233. Zhang, L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells / L. Zhang, L. Cui // *Toxicology in Vitro*. – 2007. –Vol. 21, №. 6. – P. 1095-1103.

234. Zhang, L. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells / L. Zhang, L.J. Wei // *Life Sci*. – 2007. – Vol. 80. – P. 1189-1197.

235. Zhang, Y.J. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity / Y.J. Zhang, J.H Wang, W.H Lee, Q. Wang, H. Liu, Y.T Zheng, Y. Zhang // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2003. – Vol. 309, № 3. – P. 598-604.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. **Макрушин К.В.** Поиск продуцентов L-лизин- α -оксидазы среди грибов рода *Trichoderma* / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Н.И. Чигинёва, Е.В. Лукашёва, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Биотехнология. – 2011. – № 5. – С 44-49. Импакт-фактор РИНЦ 1,636
2. Аринбасарова А.Ю. Образование внеклеточных H_2O_2 и L-лизин- α -оксидазы в процессе глубинного роста гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D при солевом стрессе / А.Ю. Аринбасарова, **К.В. Макрушин**, А.Г. Меденцев, Е.В. Лукашева, Т.Т. Березов // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 6. – С. 741-744. Импакт-фактор РИНЦ 1,45
3. **Makrushin K.V.** Isolation, purification and some properties of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma* sp. 6 / **K.V. Makrushin**, A.G. Medentzev, A.Y. Arinbasarova, E.V. Lukasheva, T.T. Berezov // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. Nova Science Publishers, Inc. – 2012. – С. 7-15.
4. **Макрушин К.В.** Синтез L-лизин- α -оксидазы грибами *Trichoderma* в условиях глубинного культивирования / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Биотехнология. – 2012. – № 4. – С. 39-44. Импакт-фактор РИНЦ 1,636
5. Аринбасарова А.Ю. Выделение и свойства L-лизин- α -оксидазы из гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D / А.Ю. Аринбасарова, В.В. Ашин, **К.В. Макрушин**, А.Г. Меденцев, Е.В. Лукашева, Т.Т. Березов // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 5. – С. 594-599. Импакт-фактор РИНЦ 1,45

Тезисы:

1. Лукашева Е.В., Жукова О.С., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г., **Макрушин К.В.**, Трещалина Е.М., Барышников А.Ю., Березов Т.Т. Получение конъюгатов L-лизин- α -оксидазы с антителами и изучение их цитотоксичности. Материалы конференции Российского биотерапевтического журнала. Москва 2009, Т. 8, № 3, С 80
2. **Макрушин К.В.** Биосинтез L-лизин- α -оксидазы грибами рода *Trichoderma* / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев, Т.Т. Березов // Тезисы докладов V Московского международного конгресса «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития». Москва, 2009. – С. 44.
3. **Макрушин К.В.** Регуляция синтеза L-лизин-альфа-оксидазы грибом *Trichoderma* sp / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев // Биология -

наука XXI века: тезисы 14-й Пушинской школы конференции молодых ученых. Пушкино, 2010. – Т. 1. – С. 263.

4. **Макрушин К.В.** Выделение, очистка и некоторые свойства L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. 6 / **К.В. Макрушин**, А.Ю. Аринбасарова, В.И. Крупяно, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев // Тезисы докладов VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2011. – Т. 1. – С. 117.

5. **Макрушин К.В.** Внеклеточная L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* rifai ВКМ F-4268D и развитие системной устойчивости растений / **К.В. Макрушин**, А.Г. Меденцев, Е.В. Лукашева, А.Ю. Аринбасарова // Тезисы докладов IX Московского международного конгресса «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития» Москва, 2017. – Т. 2. – С. 75-77.

6. **Макрушин К. В.** Зачем грибы *Trichoderma* синтезируют внеклеточную L-лизин- α -оксидазу / **К.В. Макрушин**, Б.П. Баскунов, А.Ю. Аринбасарова, А.Г. Меденцев // Тезисы IV Пушинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Пушкино, 2017. – С. 79-80.

7. Аринбасарова А.Ю. Физиолого-биохимические аспекты синтеза L-лизин- α -оксидазы грибом *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D / А.Ю. Аринбасарова, **К.В. Макрушин**, Е.В. Лукашева, А.Г. Меденцев // Современная микология в России. Материалы 4-го Съезда микологов России. Москва, 2017. – Т. 7. – № 9. – С. 297-298.